

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III
Der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Wolfgang Hiddemann

**Generierung und Charakterisierung
von Anti-CD25 Antikörper-Tubulysin-Konjugaten für die
Immuntherapie bei Akuter Myeloischer Leukämie**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Michael Roiss

aus
Linz

2016

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Marion Subklewe

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Marcus Hentrich
Prof. Dr. Martin Dreyling

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Barbara Beck

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 14.07.2016

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Die akute myeloische Leukämie.....	1
1.2. Antikörperbasierte Tumorthherapie.....	3
1.3. Tumorthherapie mittels Antibody-Drug-Konjugaten (ADC)	4
2. Fragestellung und Konzept.....	7
2.1. Ziel der Arbeit	7
2.2. Bestandteile des Projekts.....	7
2.2.1. Das Ziel: CD25	7
2.2.2. Der Antikörper: Anti-TAC.....	7
2.2.3. Das Toxin: Tubulysin A	7
2.3. Projektprozess.....	8
3. Material und Methoden	11
3.1. Material.....	11
3.1.1. Geräte	11
3.1.2. Verbrauchsmaterialien	11
3.1.3. Chemikalien, Puffer und Lösungen	12
3.1.4. Antikörper	14
3.1.5. Kits	14
3.1.6. Zelllinien	14
3.2. Methoden	15
3.2.1. Zellkultur	15
3.2.2. Zellzählung und Viabilitätsmessung	15
3.2.3. Isolierung mononukleärer Zellen aus Knochenmarksblut	15
3.2.4. HSC-Isolation mittels magnetic activated cell separation (MACS) Separation	16
3.2.5. Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bicinchoninsäure-Test (BCA)	17
3.2.6. Water Soluble Tetrazolium-1-(WST-1) Test.....	18
3.2.7. Bestimmung der Anzahl freier Thiol-Gruppen an Molekülen.....	19
3.2.8. Molecular Weight Cut Off (MWCO)-Filtration	20
3.2.9. Konjugation der Antikörper.....	20
3.2.9.1. Vorbereitung	20
3.2.9.2. Partielle Reduktion der Antikörper für die Konjugation.....	21
3.2.9.3. Konjugation.....	21
3.2.9.4. Reaktionsstopp mittels N-ACC	21
3.2.9.5. Reinigung mittels PD-10-Säule	22
3.2.9.6. Reinigung mittels Protein-A/G-Säule	22

3.2.9.7. MWCO Filtration mit spezifischen Reinigungslösungen	23
3.2.9.8. Sterilfiltration	23
3.2.10. Colony Forming Unit Assay	23
3.2.11. Toxizitätsmessung mittels CFU Assay	24
3.2.12. Durchflusszytometrie	25
3.2.13. Toxizitätsmessungen mittels Durchflusszytometrie	25
3.2.14. HPLC	26
3.2.15. Statistik	26
4. Ergebnisse	27
4.1. CD25 Targetvalidation	27
4.2. Etablierung des <i>in vitro</i> Systems	33
4.2.1. CD25-Expression auf den Zelllinien	33
4.2.2. Zytotoxizität des unkonjugierten Anti-TAC Antikörpers	34
4.2.3. Zytotoxizität des Tubulysins	36
4.3. Herstellung des Konjugats	39
4.3.1. Reduzierbare Disulfidbrücken am Antikörper Anti-TAC	39
4.3.2. Prozessplanung	41
4.3.3. Ausgangsdaten	41
4.3.4. Partielle Reduktion der Antikörper	41
4.3.5. Konjugation des TAM-Moleküls an die freien Thiol-Gruppen	42
4.3.6. Reinigung der Konjugate	44
4.4. Testung des Konjugats	47
4.4.1. Drugload und Reinheit der hergestellten ADCs	47
4.4.2. <i>In vitro</i> Toxizitätsmessungen des TAC-ADCs	49
5. Diskussion	52
5.1. CD25 – ein geeignetes Ziel?	52
5.2. Tubulysin als <i>toxic Payload</i> ?	53
5.3. Das TAC-ADC	54
6. Zusammenfassung	55
7. Literaturverzeichnis	57
8. Anlagen	62
8.1. Abkürzungsverzeichnis	62
8.2. Danksagung	64

1. Einleitung

1.1. Die akute myeloische Leukämie

Maligne Erkrankungen und im Besonderen die hämatologischen Neoplasien sind komplex und gewinnen nicht nur durch den demographischen Wandel in unserer Gesellschaft immer mehr an Bedeutung. Umfangreiche Forschungsanstrengungen werden unternommen, um offene Fragen zu beantworten und das Wesen dieser Erkrankungen besser zu verstehen. Bekannt ist, dass es sich beim Krankheitsbild der akuten myeloischen Leukämie (AML) um eine klonale Erkrankung der Vorläuferzellen des blutbildenden Systems handelt. Die bei der AML betroffenen myeloischen Zellen verlieren ihre Differenzierungsfähigkeit und beginnen unkontrolliert zu proliferieren. Die Bildung dieser funktionslosen AML-Blasten führt zur Verdrängung und Insuffizienz der übrigen physiologischen Myelopoese und damit zum Mangel an Erythrozyten, Granulozyten, Monozyten und Thrombozyten.¹ Die Folgen für den Patienten bestehen zu Beginn aus unspezifischen Symptomen wie Abgeschlagenheit, einer erhöhten Blutungsneigung und rezidivierenden fieberhaften Infekten. Im Verlauf kann es zur Infiltration von Organen wie der Leber oder der Milz kommen, wodurch organspezifische Symptome folgen. Bei Leukozytenzahlen von über 100.000 pro µl Blut droht eine Leukostase mit zerebrovaskulären Symptomen.²

Im Schnitt sind rund 3,8 pro 100.000 Menschen von der AML betroffen. In der Gruppe der über 65-jährigen steigt die Prävalenz sogar auf 17,9 pro 100.000. Zu den Risikofaktoren gehören neben dem Alter auch ionisierende Strahlung, Benzolexposition, wie sie vor allem beim Rauchen von Zigaretten vorkommt, und die Behandlung mit zytotoxischen Substanzen im Rahmen einer Chemotherapie.¹

Für die Klassifikation der AML stehen heute zwei Systeme zur Verfügung, welche die Heterogenität der Erkrankung widerspiegeln. Seit 1985 findet die auf der Zytomorphologie und den zytochemischen Eigenschaften der Blasten basierende heutige Version der French-American-British (FAB)-Klassifikation Anwendung.³

Gegenüber der FAB-Klassifikation, welche immer mehr an Relevanz verliert, gewinnt die aktuellere World Health Organization (WHO)-Klassifikation zunehmend an Bedeutung. Diese umfasst vier Hauptkategorien und bezieht zytogenetische Faktoren bei der Einordnung in diese Kategorien mit ein. Der für die Diagnose erforderliche minimale Blastenanteil liegt bei der WHO-Klassifikation grundsätzlich bei 20%, wobei seit 2008 bestimmte genetische Veränderungen die Diagnose auch unabhängig vom Blastenanteil zulassen.^{4,5}

Die Therapie der AML umfasst heute in der Regel zwei Phasen. Das Ziel der ersten Phase, der Induktionstherapie, ist es, eine komplette Remission zu erreichen. Eine komplette Remission ist erreicht, wenn die Zahl der Blasten im Knochenmark auf unter 5% gesunken ist. Die Zahl der neutrophilen Granulozyten muss auf über 1000 pro μl und die der Thrombozyten auf über 100 000 pro μl angestiegen sein. Als Standardtherapie kommen Daunorubicin und Cytarabine zum Einsatz, wodurch in 65% bis 75% der Fälle, bei Patienten zwischen 18 und 60 Jahren, eine komplette Remission erreicht werden kann. Nur wenn das gelingt, kann von einer Verlängerung der Überlebenszeit ausgegangen werden.¹ Die Postremissionstherapie ist die zweite Phase der Therapie und dient der Eliminierung verbleibender chemorefraktärer Leukämiezellen. Die Eliminierung dieser Zellen ist für den langfristigen Therapieerfolg von zentraler Bedeutung, da in ihrem Verbleib der Grund für die hohen Rezidivraten von 50% bis 70% der Patienten unter 60 Jahren vermutet wird.¹³

Neben der high-dose Applikation von Cytarabine stellt die allogene Stammzelltransplantation eine wesentliche Therapieoption dar, bei der nach myeloablativer Therapie Stammzellen eines passenden Spenders transfundiert werden.⁶ Eine wesentlicher Grund für die längerfristige Wirksamkeit der allogenen Stammzelltransplantation ist der Graft-versus-Leukämie (GVL) Effekt.⁷ Dieser basiert auf den T-Lymphozyten und NK-Zellen des Spenders, welche in der Lage sind, verbleibende leukämische Zellen zu zerstören und deren erneute Proliferation zu verhindern. Damit stellt der GVL-Effekt einen zentralen Mechanismus für die Wirksamkeit der allogenen Stammzelltransplantation im Rahmen der Therapie maligner hämatologischer Erkrankungen dar.⁸ Diese Wirksamkeit der Stammzelltransplantation ist allerdings auch mit erheblichen Risiken für den Patienten verbunden und geht mit einer hohen Rate an schwerwiegenden Komplikationen einher. Infektionen oder die Graft versus Host (GVH) Reaktion beispielsweise, führen zu einer erhöhten therapiebezogenen Mortalität und beschränken die Anwendbarkeit auf junge Patienten.⁹ Die weitere Entwicklung neuer immuntherapeutischer Strategien ist also notwendig, um in Zukunft auch für ein breites Patientenkollektiv eine nachhaltigere Therapieoption zur Verfügung zu haben.¹⁰

Wie dringend diese neuen Optionen gebraucht werden, wird auch klar, wenn man sich vor Augen führt, dass trotz aller Anstrengungen die Fünfjahresüberlebensrate für die Gruppe der unter 60-jährigen nur bei 40% bis 45% und für über 60-jährige Patienten gar nur bei 10% liegt.^{11,12}

Umfangreiche Forschungsanstrengungen bemühen sich daher die Gründe für die hohen Rezidivraten und das Wesen chemorefraktärer Leukämiezellen besser zu verstehen. In diesem Zusammenhang steht auch das Konzept der leukämischen Stammzellen (LSCs). Diese teilen mit den gesunden hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) viele gemeinsame Eigenschaften, was sie zu einem schwierigen Ziel für konventionelle Therapieregime macht.

Sie besitzen die Fähigkeit zur Differenzierung und Selbsterneuerung und verdrängen gesunde Stammzellen aus ihrer Nische im Knochenmark. In der sicheren Identifizierung und Elimination der LSCs wird heute der Schlüssel zur nachhaltigen Remission vermutet.¹⁴

Die Ursprünge dieses Gedankens gehen auf das Jahr 1997 zurück, als Bonnet und Dick leukämische Zellen in ein Mausmodell transplantierten und zeigen konnten, dass die vermuteten LSCs innerhalb einer bestimmten Zellfraktion liegen, welche als CD34^{pos} CD38^{neg} identifiziert werden konnte. Diese Fraktion zeigte nach der Transplantation eine Proliferation und Differenzierung, die zum Auftreten des gleichen AML-Typs führte.¹⁵ Mittlerweile konnten auch Oberflächenmoleküle mit einer gegenüber normalen HSC erhöhten Expression auf LSCs gefunden werden. Die Moleküle CD123, CD44, CLL-1, CD47, CD25 und CD32 zeigen diese erhöhte Expression und stellen potenzielle Ziele neuerer Therapieregime dar.¹⁴

1.2. Antikörperbasierte Tumorthherapie

Die antikörperbasierte Tumorthherapie stellt zur Zeit eine der bedeutendsten und erfolgreichsten Möglichkeiten dar, hämatologische und solide Neoplasien zu therapieren. Der Grundstein für diesen Erfolg wurde in den 1960ern durch die Entdeckung von tumorassoziierten Antigenen gelegt. Die Beschaffenheit dieser Antigene ist entscheidend für die Wirksamkeit und die Sicherheit von therapeutisch genutzten monoklonalen Antikörpern. Im Idealfall finden sich die Antigene ausschließlich auf den Zielzellen und sind gleichmäßig und regelmäßig auf ihrer Oberfläche exprimiert.

Zudem ist die Erreichbarkeit und das Internalisierungsverhalten der Rezeptoren entscheidend für die Entfaltung der entsprechenden antikörperbasierten Wirkung.

Durch das Aufkommen neuerer Technologien zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern und Analyseverfahren wie dem Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS), konnten viele Erkenntnisse über die Beschaffenheit der Zelloberfläche und den darauf exprimierten Antigenen gewonnen werden. Ein ideales Antigen, welches alle oben beschriebenen Anforderungen erfüllt, konnte allerdings bis heute nicht gefunden werden. Obwohl absolut tumorspezifische Antigene also nach wie vor fehlen, konnten doch Antikörper identifiziert werden, welche vermehrt an neoplastische Tumorzellen binden und dadurch zwar keine absolute, aber eine hohe Tumorspezifität aufweisen.

Die Möglichkeiten, den gezielten Zelluntergang mit Hilfe dieser Antikörper herbeizuführen, sind vielseitig. Grundsätzlich lassen sich aber drei Mechanismen unterscheiden. Erstens die direkte Wirkung des Antikörpers durch Rezeptorblockade, agonistische Wirkung, Apoptoseinduktion oder das Einschleusen von Toxinen über Toxin-konjugierte Antikörper, wie sie auch in dieser Arbeit verwendet wurden.

Das Ziel der Tumorthherapie mittels ADCs ist es, hoch potente zytotoxische Substanzen gezielt in Tumorzellen einzuschleusen, im Inneren freizusetzen und dabei gesundes Gewebe zu schonen. Um dieses Ziel möglichst effektiv zu erreichen, müssen die drei Bestandteile des ADCs, Antikörper, Linker und Toxin (*toxic Payload*) gewisse Voraussetzungen erfüllen. Der Antikörper muss auch nach der Konjugation mit dem Toxin noch spezifisch an sein Ziel (*target*) binden und darf nicht zu früh abgebaut werden. Auch die Internalisierung darf durch die Konjugation nicht behindert werden. Das Toxin muss hoch potent sein, da nur eine kleine Menge in die Zellen eingebracht werden kann, und über validierte Wirkmechanismen verfügen. Plasmastabilität und intrazelluläre Freisetzung sind die wesentlichen Erfolgsfaktoren für effiziente Linkermoleküle.^{18,19,20}

Unzureichende Tumorselektivität, die Verwendung von immunogenen murinen Antikörpern und zu schwache Toxine verhinderten den Erfolg erster ADC-Präparate. Auch die Linkermoleküle, über welche die Toxine mit dem Antikörper verbunden sind, waren meist instabil und wenig zuverlässig.²¹

Dank intensiver Forschungen in nahezu allen Bereichen, welche für die Entwicklung von ADCs erforderlich sind, konnten viele der ursprünglichen Probleme mittlerweile gelöst werden. Heutige Präparate basieren auf humanisierten oder gänzlich humanen Antikörpern und Toxinen, welche 100 bis 1000-fach stärker toxisch sind als damalige. Diese Toxine haben eine mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50} -Werte) im picomolaren Bereich und entfalten ihre Wirkung durch den Angriff auf die DNA oder das Tubulin der Zielzelle. Moderne Linkermoleküle binden meist an die Lysine oder Thiole der Antikörper. Der so erreichte „Drugload“, also die Anzahl der an den Antikörper konjugierten Toxin-Moleküle, hat entscheidende Auswirkungen auf die Plasmahalbwertszeit des Konjugats und das Internalisierungsverhalten und muss daher als kritischer Faktor für die pharmakologischen Eigenschaften der ADCs gesehen werden.²²

Die intrazelluläre Freisetzung des Toxins erfolgt lysosomal oder, wie es bei disulfidbasierten Molekülen der Fall ist, durch das reduktive Milieu im Zytoplasma.¹⁸

Das erste von der amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) zugelassene ADC kam im Jahr 2000 auf den Markt. Mylotarg wurde zur Behandlung von AML Patienten entwickelt, 2010 aber wieder vom Markt genommen, nachdem die Wirksamkeitsvorgaben der FDA in weiterführenden Studien nicht erfüllt werden konnten. Trotz dieses Rückschlags geht die ADC-Entwicklung weiter und so wurden im Jahr 2011 rund 20 verschiedene ADCs in frühen klinischen Studien getestet.^{18,23} Darunter Brentuximab vedotin und Transtuzumab emtansine, die mittlerweile von der amerikanischen FDA zugelassen wurden.²⁴ Ein Überblick über den aktuellen Stand weiterer ADCs, welche zur Zeit in Studien getestet werden, gibt Tabelle 1.

Tabelle 1: Übersicht ADC-Präparate 2014

ADC	Indikation	Ziel	Toxin	Phase
Inotuzumab ozogamicin	Aggressives NHL; ALL	CD22	Calicheamycin	III
RG-7596	DLBCL und follikuläres NHL	CD79b	MMAE	II
Pinatuzumab vedotin (RG-7593)	DLBCL und follikuläres NHL	CD22	MMAE	II
Glembatumumab vedotin	Mamma-CA	GPNMB	MMAE	II
SAR-3419	DLBCL; ALL	CD19	DM4	II
Lorvotuzumab mertansine	SCLC	CD56	DM1	II
BT-062	MM	CD138	DM4	II
PSMA-ADC	Prostata-CA	PSMA	MMAE	II
ABT-414	Glioblastom; NSCLC; Solide Tumoren	EGFR	Nicht bekannt	I/II
Milatuzumab doxorubicin	CLL; MM; NHL	CD74	Doxorubicin	I/II
IMMU-132	Solide Tumoren	TACSTD2	Irinotecan Metabolit	I
Labetuzumab-SN-38	Kolorektales-CA	CEA	Irinotecan Metabolit	I
IMGN-853	Ovarial-CA; Solide Tumoren	Folat Rezeptor 1	DM4	I
IMGN-529	B-Zell Lymphom; CLL; NHL	CD37	DM1	I
RG-7458	Ovarial-CA	Mucin 16	MMAE	I
RG-7636	Melanom	Endothelin Rezeptor ETB	MMAE	I
RG-7450	Prostata-CA	STEAP1	MMAE	I
RG-7600	Ovarial-CA; Pankreas-CA	Nicht bekannt	Nicht bekannt	I
RG-7598	MM	Nicht bekannt	Nicht bekannt	I
RG-7599	NSCLC; Ovarial-CA	Nicht bekannt	Nicht bekannt	I
SGN-CD19A	ALL, aggressives NHL	CD19	MMAE	I
Vorsetuzumab mafodotin	NHL; Nierenzell-CA	CD70	MMAF	I
ASG-5ME	Pankreas-CA	SLC44A4	MMAE	I
ASG-22ME	Solide Tumoren	Nectin 4	MMAE	I
AGS-16M8F	Nierenzell-CA	AGS-16	MMAF	I
MLN-0264	Gastrointestinale Tumoren	Guanylyl cyclase C	MMAE	I
SAR-566658	Solide Tumoren	Mucin 1	DM4	I
AMG-172	Nierenzell-CA	CD70	Nicht bekannt	I
AMG-595	Gliom	EGFRvIII	DM1	I
BAY-94-9343	Mesotheliom	Mesothelin	DM4	I

Modifiziert nach Mullard, 2013. ²⁴

2. Fragestellung und Konzept

2.1. Ziel der Arbeit

Die vorliegende Arbeit sollte zeigen, ob das Toxin Tubulysin A als *toxic Payload* eines ADCs für die Immuntherapie bei AML geeignet ist und ob das Oberflächenantigen CD25 ein geeignetes Ziel einer solchen Therapie darstellt.

2.2. Bestandteile des Projekts

2.2.1. Das Ziel: CD25

Bei dem Oberflächenmolekül CD25 handelt es sich um die Alpha-Untereinheit des Interleukin (IL)-2 Rezeptors. CD25 lässt sich in Studien mittels Durchflusszytometrie auf rund 25% der LSCs nachweisen und scheint als potentiell Ziel für die zielgerichtete Therapie geeignet zu sein, weil es auf gesunden HSCs nicht exprimiert wird. Ergänzend zu diesen Eigenschaften weisen neuere Daten auch auf eine Assoziation zwischen hoher CD25 Expression und schlechter Prognose bzw. einem erhöhtem Risiko für das Auftreten der minimalen Resterkrankung (MRD) hin.²⁵

2.2.2. Der Antikörper: Anti-TAC

Der monoklonale Antikörper Anti-TAC wurde 1981 entwickelt und ist gegen die oben beschriebene Alpha-Untereinheit des Interleukin-2 Rezeptors gerichtet. 1997 erfolgte die Zulassung durch die FDA für die humanisierte Form Daclizumab für die Therapie der Organabstoßung im Rahmen von Nierentransplantationen. Zusätzlich zu dieser Anwendung wurden auch klinische Studien zu den Einsatzmöglichkeiten von Daclizumab bei CD25 positiven Leukämie- und Lymphomformen durchgeführt. Diese zeigten bei der adulten T-Zell Leukämie (ATL) ein teilweises Ansprechen der Erkrankung unter relativ hohen Dosen von 8 mg/kg Körpergewicht alle drei Wochen. Um die zytotoxische Wirkung zu erhöhen, gelten die aktuellen Bestrebungen nun Versuchen zur Toxin- oder Radionuklidkopplung des Antikörpers.²⁶

2.2.3. Das Toxin: Tubulysin A

Bei der Stoffklasse der Tubulysine handelt es sich um natürlich vorkommende Tetrapeptide, die aus Myxobakterienstämmen isoliert werden.²⁷ Anders als Epothilone und Taxole, die zur Polymerisation von Tubulin führen, depolymerisieren Tubulysine die Mikrotubuli und wirken antimitotisch und pro-apoptotisch. Tubulysine binden an die Vinca Stelle des Tubulins, ohne kompetitive Effekte mit Vinca-Alkaloiden wie Vincristin zu zeigen.

Außerdem existiert keine bekannte Wechselwirkung zum Cytochrom P450 System, was das Auftreten von Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten reduziert.

Die hohe Toxizität der Tubulysine macht einen Einsatz als Wirkstoffe in der Medizin bislang schwierig, weshalb versucht wird, über die Verbindung mit Nanopartikeln oder anderen Molekülen eine möglichst gezielte Wirkung im Körper zu erreichen. Nur wenn das gelingt, lässt sich das Potential der Tubulysine für therapeutische Anwendungen nutzen.²⁸

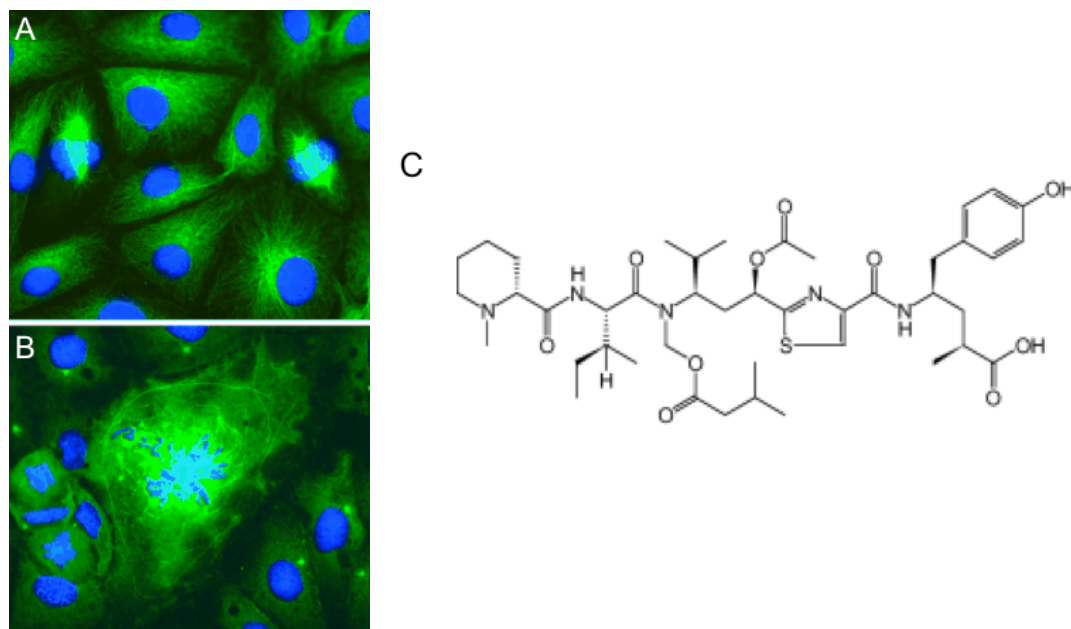


Abbildung 2: Wirkmechanismus (A,B) und Strukturformel (C) des Tubulysin A

A: Gezeigt sind Zellen in der Interphase und deren normal ausgebildete Mikrotubuli (Grün). Zwei mitotische Zellen zeigen ausgebildete bipolare Spindelapparate. Blau dargestellt sind Chromosomen und Nuclei. B: Die mit Tubulysin A behandelten Zellen zeigen ein weniger dichtes Netzwerk aus Mikrotubuli. Die mitotische Zelle in der Mitte zeigt keinen regelrecht ausgeprägten Spindelapparat. C: Strukturformel des Tubulysin A.

Modifiziert nach Khalil, 2006.²⁷

2.3. Projektprozess

Um die unter 2.1. genannten Ziele des Projektes zu erreichen wurde ein vierteiliger Prozess entwickelt.

1. Targetvalidierung:

Im Rahmen der Targetvalidierung wurde die CD25-Expression auf AML Zellen und LSCs untersucht und mit einem anderen Marker verglichen.

Hierfür wurde gemeinsam mit dem Labor für Leukämiediagnostik des Klinikums der Universität München eine Datenbank mit durchflusszytometrischen Daten von rund 50 AML-Patienten aufgebaut. Die Entwicklung einer Strategie zur Auswertung der Daten, die Auswertung der Daten an sich, sowie die statistische Aufbereitung waren Teil dieser Arbeit.

2. Herstellung des eigenen Anti-CD25-Tubulysin-Konjugats :

Die Herstellung des Konjugats erfolgte über die Konjugation des Linkermoleküls „TAM“, welches das Tubulysin A trägt und von Tube Pharmaceuticals zur Verfügung gestellt wurde, an freie Thiolgruppen des Antikörpers Anti-TAC. Hierzu wurden die Disulfidbrücken der Hinge Region des Antikörpers mittels des Reduktionsmittels DL-Dithiothreitol (DTT) teilweise reduziert, ohne den Antikörper in seiner Struktur gänzlich zu zerstören.

Nach der eigentlichen Konjugation wurde überschüssiges TAM bzw. Tubulysin A durch mehrere Reinigungsschritte entfernt. Abbildung 3 zeigt den vierstufigen Prozess, welcher für die Konjugation entwickelt wurde.

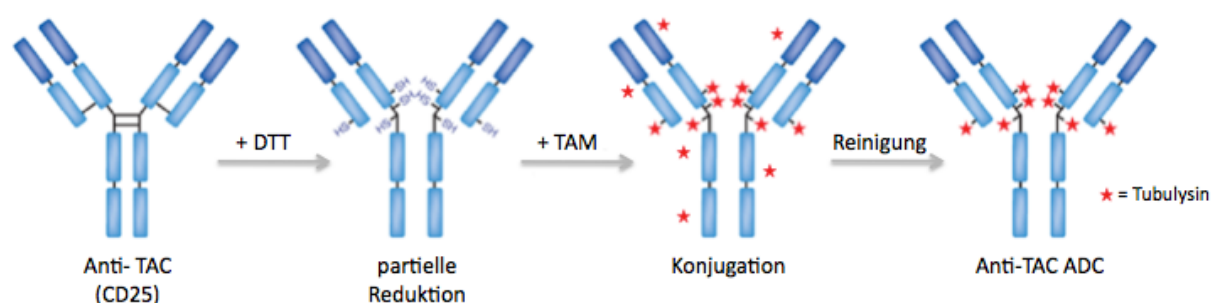


Abbildung 3: Herstellungsprozess

Gezeigt sind die drei wesentlichen Schritte des Herstellungsprozesses und der Reinigungsschritt. Das Bild äußerst rechts verdeutlicht, dass die Disulfidbrücken des Antikörpers im Bereich der Hinge Region geöffnet wurden.

Modifiziert nach Damle, 2008.²⁹

Um den Erfolg der einzelnen Prozessschritte verfolgen zu können, wurde eine Methode entwickelt, um die Anzahl der freien Thiole am Antikörper nach jedem Schritt messen zu können.

Nach Abschluss des Herstellungsprozesses erfolgte eine High Performance Liquid Chromatography (HPLC)-Analyse mit Massenspektrometrie, welche Aufschluss über den tatsächlichen Zustand des Antikörpers, den messbaren Drugload und die Reinheit des Konjugats gab. Dieser Schritt konnte letztlich zeigen, ob der Herstellungsprozess erfolgreich war und das zuvor berechnete Modell für die Konjugation zutraf.

3. Etablierung des *in vitro* Systems:

Um die zytotoxische Wirkung des TAC-Konjugats bestimmen zu können, wurde die Wirkung des Tubulysins und die des nativen Antikörpers alleine, auf CD25 positiven Karpas 299 und CD25 negativen OCI Zellen getestet und mit der des generierten Anti-CD25 TAC-Konjugats verglichen. Um Hinweise für die Wirkung des Tubulysins auf LSCs zu zeigen, wurde ein Colony Forming Units (CFU)-Assay etabliert und in einem ersten Schritt mit HSCs durchgeführt.

4. Testung des Konjugats

Die Wirkung des Konjugats wurde hinsichtlich der Zytotoxizität gegen CD25 positive Zellen und der Selektivität im Bezug auf CD25 negative Zellen getestet.

Zur Erhebung dieser Daten wurden Zellen verschiedenen Konzentrationen des Konjugats ausgesetzt. Anschließend wurde die Wachstumsfähigkeit der verbleibenden Zellen gemessen. Hierfür wurde eine Versuchsreihe etabliert, dessen Ergebnis mittels durchflusszytometrischer Methoden erfasst werden konnte.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Geräte

Lamina Flow Werkbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen, D
Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Eppendorf Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg, D
Zellzählgerät	Life Technologies, New York, USA
Mikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar, D
Invertiertes Mikroskop	Zeiss, Jena, D
Inkubator	Binder, Tuttlingen, D
FACSCalibur	BD, New Jersey, USA
Microplate-Reader	Tecan Group, Männedorf, CH
Wasserbad	Julabo, Seelbach, D
Kühlschrank (2 °C-8 °C)	Liebherr, Bulle, CH
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr, Bulle, CH
Gefrierschrank (-80 °C)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kolbenhubpipetten	Eppendorf, Hamburg, D
PipettBoy acu	Integra Biosciences, Fernwald, D
Vortex Mischer	Scientific Industries, Bohemia, USA
Schüttler	IKA, Staufen, D

3.1.2. Verbrauchsmaterialien

Polypropylen-Zentrifugenröhrchen 1,5/ 2 ml	Eppendorf, Hamburg, D
Polypropylen-Zentrifugenröhrchen 15/ 50 ml	BD, New Jersey, USA
Polystyrene-round-bottom-tube 5 ml	BD, New Jersey, USA
Spin-X Filter	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kultur Schalen für Methylcellulose	Stemcell Technologies, Vancouver, Can
Blunt End Needles 16G	Miltenyi Biotec, Auburn, USA
Pipettenspitzen 0,5-20/ 2-200/ 50-1000 µl	Eppendorf, Hamburg, D
Serologische Pipetten 5/ 10/ 25 ml	BD, New Jersey, USA
Zellkulturschale 6/ 96 well	BD, New Jersey, USA
Pasteurpipetten	VWR, Darmstadt, D
Zellkulturschale 35/ 100 mm	Stemcell Technologies, Vancouver, Can
Zellkulturflaschen 50 ml	BD, New Jersey, USA

3.1.3. Chemikalien, Puffer und Lösungen

Wasser, steril	Helmholzzentrum, München, D
Wasser, deionisiert	Helmholzzentrum München, D
Wasser, MilliQ	Helmholzzentrum München, D
Wasser, DEPC	Carl Roth GmbH u. Co KG, Karlsruhe, D
Tween 20	Carl Roth GmbH u. Co KG, Karlsruhe, D
Natriumazid	Carl Roth GmbH u. Co KG, Karlsruhe, D
2,2'-Dinitro-5,5'-dithiodibenzoesäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DL-Dithiothreitol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
N-Acetyl-L-Cysteine	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
0,5 EDTA, pH 8,0	Gibco Invitrogen, New York, USA
Methanol (80%)	Merck KGaA Darmstadt, D
Natronlauge 4 mol / L	Carl Roth GmbH u. Co KG, Karlsruhe, D
Salzsäure 6 mol / L	Carl Roth GmbH u. Co KG, Karlsruhe, D
Phosphate buffered saline (PBS)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, D
Tris HCL 1,5 mol/L pH 8,8	Apotheke Klinikum Universität München
Cell Proliferation Reagent WST-1	Hoffmann-La Roche, Nutley, USA
Biocoll-Separationslösung	Biochrom AG, Berlin, D
DMSO	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypanblau	Life Technologies, New York, USA
Tublysin A	TUBE Pharma, Wien, AUT
TAM	TUBE Pharma, Wien, AUT
VLE RPMI	Pan Biotech GmbH, Aidenbach, D
RPMI 1640	Pan Biotech GmbH, Aidenbach, D
FcR-Block	Miltenyi Biotec, Auburn, USA
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Life Technologies, New York, USA
Hepes	Biochrom AG, Berlin, D
Glutamin	Life Technologies, New York, USA
Fetales Kälberserum (FCS)	Life Technologies, New York, USA
Methocult H4034 Optimum	Stemcell Technologies, Vancouver, Can

FACS-Puffer	PBS + 5 % FCS
FACS-Fix	PBS + 0,5 % PFA
MACS-Puffer	PBS + 5 % FCS
R10 Medium	RPMI 1640 +10% FCS +1% Penicillin / Steptolysin + 5% Hepes + 5% Glutamin
Dilution Buffer pH 8,2	30 mM Tris (HCL) pH 6,8 +3 mM EDTA)
DTNB Working Solution	25 ml Methanol (80%) +29,7 mg DTNB
1mM <i>N</i> -ACC Stocklösung	100 ml MilliQ H ₂ O +16,3 mg <i>N</i> -ACC
1M NaCl	20 ml MilliQ H ₂ O + 1,16 g NaCl
0,1% TWEEN	15 ml Binding Buffer (Prot. A/G-Kit) + 15 µl TWEEN
Conjugation Buffer pH 9,2	1000ml MilliQ H ₂ O + 4,03 g NaHCO ₃ + 0,21g Na ₂ CO ₃ + 8,76 g NaCl

3.1.4. Antikörper

UPC-10 IgG2a, murine, Lot. 061M4797V
Anti-TAC IgG1, humanisiert, RO 24-7375
Anti-CD25 PE IgG2b, murine
Isotyp IgG2b PE, murine

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Hoffmann-La Roche, Nutley, USA
Miltenyi Biotec, Auburn, USA
Miltenyi Biotec, Auburn, USA

3.1.5. Kits

Pierce BCA Protein Assay Kit, No. 23227
PD-10 Kit, No. 17-0851-01
NAb Protein A/G Spin Kit, No.89980
CD34 Isolation Kit, No. 130-094-531

Thermo Scientific Rockford, USA
GE Healthcare Life Sciences, USA
Thermo Scientific Rockford, USA
Miltenyi Biotec, Auburn, USA

3.1.6. Zelllinien

Karpas 299, humane T-Zell-Lymphom
OCI M2, humane AML

DSMZ, Braunschweig, D
DSMZ, Braunschweig, D

3.2. Methoden

3.2.1. Zellkultur

Die Zelllinien Karpas 299 und OCI wurden in 25 ml Kulturflaschen als Suspension mit R10 Medium bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und einem 5 % CO₂ –Luftgemisch kultiviert. Im 72 h Rhythmus wurden die Zellen mittels Lichtmikroskop auf Infektionen und Zelltod überprüft. Die Zellkonzentration wurde ebenfalls in dreitägigem Abstand mittels Zellzählung bestimmt. Durch Ersetzen des entsprechenden Volumens der Zellsuspension mit neuem R10 Medium wurde jeweils eine Konzentration von 2×10^5 Zellen pro ml eingestellt. Überschüssige Zellen wurden verworfen.

3.2.2. Zellzählung und Viabilitätsmessung

Die zu zählenden Zellen wurden gleichmäßig im Medium verteilt. Anschließend wurden 10 µl der Zellsuspension entnommen und in einer 96-Well-Platte mit 10 µl Trypanblau vermischt. 10 µl dieses Gemisches wurden dann in eine Zählkammer überführt und am Zellzählgerät die Zellkonzentration und Viabilität gemessen.

3.2.3. Isolierung mononukleärer Zellen aus Knochenmarksblut

Zur Isolation der mononukleären Zellen (MNC) wurde die Dichtegradientenzentrifugation angewendet, mit dessen Hilfe die MNCs von den Thrombozyten und Erythrozyten aufgrund ihrer unterschiedlichen Schwebedichte getrennt werden können. Als Trennlösung wurde Ficoll-Separationsmedium, ein synthetisches Polymer aus Saccharose, verwendet. Dieses besitzt die Eigenschaft, durch Zentrifugation eine Grenzschicht aus MNCs zwischen Ficoll und Serum zu bilden, die mit der Pipette entnommen werden kann.

Als Ausgangsmaterial wurde heparinisiertes menschliches Knochenmarksblut verwendet. Dieses wurde 1:2 mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) verdünnt. Im Anschluss daran wurden in einem 50 ml Falcon 12 ml Ficoll mit 25 ml verdünntem Knochenmarksblut vorsichtig überschichtet. Die Ansätze wurden dann bei ausgeschalteter Bremse für 30 Minuten mit 2000 rpm bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Nach dieser Dichtegradientenzentrifugation lag eine mittlere milchig-weiße Phase mit den MNCs vor. Diese Phase wurde behutsam mit einer Pasteur Pipette abgesaugt und in ein neues 50 ml Falcon mit Roswell Park Memorial Institute-Medium (RPMI) überführt.

Nach der vollständigen Übertragung der Zellen wurde das Falcon mit RPMI auf 50 ml aufgefüllt. Diese Zellsuspension wurde erneut für 10 Minuten mit 1800 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und das Zellpellet resuspendiert. Nach erneutem Auffüllen mit 50 ml RPMI wurde der vorhergegangene Zentrifugationsschritt ein letztes Mal wiederholt und der Überstand abgegossen.

Das Zellpellet wurde in 10 ml RPMI resuspendiert und eine Zellzählung wurde durchgeführt. Im Anschluss wurden die Zellen weiterverarbeitet.

3.2.4. HSC-Isolation mittels magnetic activated cell separation (MACS) Separation

Um aus MNCs die Fraktion der CD34 positiven HSCs zu isolieren wurde eine MACS Separation durchgeführt. Hierbei werden die gesuchten Zellen mit MicroBeads, mit magnetischen Partikeln versehene Antikörper, markiert und in einer Säule mit starkem Magnetfeld festgehalten, während die unmarkierten Zellen durch die Säule gespült werden. Nach der Trennung wird die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und die markierte Zellfraktion kann mit Druck aus der Säule gepresst und aufgefangen werden.

Zur Durchführung wurde das Diamond CD34 Isolation Kit von Miltenyi Biotec und das zugehörige Protokoll des Herstellers verwendet. Die im Folgenden genannten Puffer und Reagenzien waren im Kit enthalten.

Die zuvor aus humanem Knochenmarksblut isolierten MNCs wurden in polystyrene-round-bottom-tubes in 200 µl MACS-Puffer aufgenommen und auf Eis gelagert.

50 µl Diamond Lin Biotin-Antibody Cocktail wurden zugegeben und gemischt.

Nach Inkubation für 10 Minuten bei 8 °C wurden 5 ml MACS-Puffer zugegeben und die Zellsuspension für 10 Minuten mit 1800 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Das Medium wurde dekantiert und das Zellpellet in 400 µl MACS-Puffer resuspendiert. Anti-Biotin MicroBeads wurden in einem Volumen von 100 µl zugegeben und die Zellen anschließend für 15 Minuten bei 8 °C inkubiert.

Es folgte ein erneuter Waschschrift mittels 10 ml MACS-Puffer und Zentrifugation für 10 Minuten mit 1800 rpm bei 4 °C. Nach dem Dekantieren wurden die Zellen in 1 ml MACS-Puffer aufgenommen. Die vorbereiteten LD-Colums mit aufgesetztem Pre-Separation Filter wurden zweimal mit jeweils 1 ml MACS-Puffer gespült, um dann die Zellsuspension auf die Säule zu übertragen.

Die Säulen wurden jetzt erneut mit 2 ml MACS-Puffer gespült und das Eluat, welches die lineage negativen Zellen enthielt, aufgefangen.

Nach Zentrifugation für 10 Minuten mit 1800 rpm bei 4 °C wurden die Zellen in 200 µl MACS-Puffer aufgenommen und 50 µl CD34 Diamond MicroBeads zugegeben.

Es folgte ein 30 minütiger Inkubationsschritt bei 8 °C. Nach der Inkubation wurden 5 ml MACS-Puffer zugegeben und die Zellen für 10 Minuten mit 1800 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Das Röhrchen wurde dekantiert und das Zellpellet in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert. Die vorbereitete MS-Säule wurde mit 500 µl MACS-Puffer gespült und anschließend wurde die Zellsuspension auf die Säule übertragen, um diese mit 500 µl MACS-Puffer zu spülen.

Danach wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und über einem 15 ml Falcon mit 1,5 ml MACS-Puffer gespült. Der Stempel wurde aufgesetzt und die CD34 positiven, lineage negativen Zellen mit der letzten Fraktion des Puffers unter Druck aus der Säule gepresst. Der Erfolg der Separation wurde mittels Durchflusszytometrie überprüft.

3.2.5. Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bicinchoninsäure-Test (BCA)

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit dem BCA-Test eine kolorimetrische Methode gewählt, bei der zweiwertige Kupferionen quantitativ mit Protein zu einwertigen Kupferionen reagieren.

Diese reagieren wiederum mit der Bicinchoninsäure und ergeben einen violetten Farbstoff. Das Absorptionsmaximum dieses Farbstoffes liegt bei 562 nm. Anhand der Geradengleichung einer Standardkurve von 2.000 µg/ml bis 25 µg/ml können Proteinkonzentrationen innerhalb dieses Bereiches bestimmt werden. Zur Durchführung des Tests wurde das BCA-Protein Assay Kit von Pierce (Kat. No. 23225) verwendet.

Um diese für die Auswertung notwendige Standardkurve zu erhalten, wurde eine Verdünnungsreihe mit Immunglobulin G (IgG) als Protein und PBS-Puffer (pH 7,4) als Verdünnungsmittel nach folgendem Schema hergestellt:

Tabelle 2: Verdünnungsschema der Standardreihe für den BCA-Test

Ansatz (Vial)	PBS [µl]	IgG [µl]	Finale IgG Konzentration [µg/ml]
A	0	300 stock	2.000
B	125	375 stock	1.500
C	325	325 stock	1.000
D	175	175 vial B	750
E	325	325 vial C	500
F	325	325 vial E	250
G	325	325 vial F	125
H	400	325 vial G	25
I	400	0	0 = Leerwert

IgG lag im Kit als Stocklösung mit einer bekannten Konzentration von 2.000 µg/ml vor. Die benötigte BCA-Test Lösung wurde nach Herstellerangaben aus den im Kit enthaltenen Reagenzien hergestellt.

Von den jeweiligen Standardkonzentrationen sowie der zu messenden Probe wurden jeweils 25 µl als Triplikate in einer 96-Well-Platte mit flachem Boden angelegt. Unmittelbar danach wurden jeweils 200 µl der BCA-Test Lösung zugegeben. Nach vorsichtigem Durchmischen der Platte wurde diese für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation folgte eine Abkühlphase auf RT von 25 Minuten und schließlich die photometrische Vermessung bei einer Wellenlänge von 562 nm am Microplate-Reader.

Zur Auswertung wurden die Mittelwerte der Absorptionswerte der Standardkurve abzüglich des Nullwerts gegen deren Konzentrationen im Diagramm aufgetragen.

Als Nullwert wurde der Mittelwert der Absorptionen bei einer IgG-Konzentration von 0 µg/ml definiert. Es wurde dann über eine Korrelationsgerade mit zugehöriger Geradengleichung die Proteinkonzentration berechnet.

3.2.6. Water Soluble Tetrazolium-1-(WST-1) Test

Mittels des WST-1-Tests kann die metabolische Aktivität von Zellen durch deren enzymatische Dehydrogenase-Aktivität, welche den hell rötlichen Stoff WST-1 zu dem dunkel roten Stoff Formazan umwandelt, bestimmt werden.

In 96-Well-Platten mit flachem Boden wurden Fünffachansätze mit jeweils 50 µl R10 Medium und 1×10^4 Zellen pro Well angelegt. Die zu testende Substanz wurde mit R10 Medium verdünnt um die gewünschten Konzentrationen einzustellen, anschließend wurden jeweils 50 µl der jeweiligen Konzentration in die entsprechenden fünf Ansätze pipettiert. Zur Bestimmung des Leerwertes dienten fünf Wells mit jeweils 100 µl R10 Medium. Die Platten wurden nun für 72 h inkubiert, wobei der Inkubationsprozess nach 68 h unterbrochen wurde, um in jedes Well 10 µl WST-1-Reagenz zuzugeben. Nach Beendigung der restlichen 4 h Inkubationszeit wurden die Platten am Photometer bei einer Wellenlänge von 480 nm vermessen. Die Auswertung erfolgte durch Auftragen des prozentualen Zellwachstums gegen die Konzentrationen der Testsubstanzen. Die Konzentrationen wurden dabei so gewählt, dass zur Auswertung mittels Prism Software eine sigmoidale Kurve erstellt werden konnte und der IC_{50} -Wert berechnet werden konnte.

3.2.7. Bestimmung der Anzahl freier Thiol-Gruppen an Molekülen

Die Anzahl zugänglicher Thiol-Gruppen wurde anhand der Ellman-Reaktion bestimmt. Diese Methode basiert auf der Reaktion der Thiol-Gruppen mit der Disulfidbrücke des Ellman-Reagenz 2,2'-Dinitro-5,5'-dithiodibenzoessäure (DTNB). Das dabei entstehende 2-Nitro-5-thiobenzoat (NTB) reagiert weiter und bewirkt einen gelblichen Farbumschlag, welcher am Photometer quantitativ gemessen werden kann. Die Durchführung dieser Methode erfolgte gemäß den DTNB Herstellerangaben von Uptima Interchim (Kat. No. UP01566H). Sämtliche Reagenzien und Pufferlösungen, die für den Ellman-Test benötigt wurden, sind im Materialteil aufgelistet. Zur Durchführung wurde erst eine Verdünnungsreihe mit *N*-Acetyl-L-Cystein (*N*-ACC) und PBS-Puffer (pH 7,4) als Verdünnungsmittel nach folgendem Schema hergestellt:

Tabelle 3: Verdünnungsschema der Standardreihe für den Ellman-Test

Ansatz	H ₂ O dest. [µl]	<i>N</i> -ACC [µl]	Finale <i>N</i> -ACC Konzentration [µM]	SH-Gruppen / Well
C1	0	300 stock	1.000	8×10^{15}
C2	33	100 C1	750	6×10^{15}
C3	100	100 C1	500	4×10^{15}
C4	100	100 C3	250	2×10^{15}
C5	100	100 C4	125	1×10^{15}
C6	100	100 C5	62,5	5×10^{14}
C7	100	100 C6	31,5	3×10^{14}
C8	100	0	0	0

In 1,5 ml Reagiergefäßen wurden dann 200 µl Tris HCL, 20µl DTNB Working Solution und 50 µl Probe beziehungsweise Standard gemischt. Anschließend wurden in 96-Well-Platten mit flachem Boden Triplikate mit jeweils 75 µl angelegt. Die unmittelbare Messung erfolgte am Photometer bei 412 nm.

Die Auswertung erfolgte über eine Standardkurve welche die jeweilige Anzahl an freien Thiol-Gruppen pro Well und deren Absorptionswert im Photometer in Bezug setzt. Aus der Gleichung dieser Standardkurve konnte die Anzahl der Thiol-Gruppen in den Proben bestimmt werden.

Über die genaue Kenntnis der Antikörperkonzentration und des Volumens der Antikörpersuspension im Proben-Well konnte die Anzahl der Antikörpermoleküle in diesem Well bestimmt werden. Durch Division der detektierten Thiol-Gruppen durch die Anzahl der Antikörpermoleküle pro Well konnte nun die Anzahl der Thiol-Gruppen pro Antikörper berechnet werden. Zur Erstellung einer Standardkurve wurden aus den jeweiligen Konzentrationen und Mengen von *N*-ACC und Antikörper die Anzahl der jeweiligen Moleküle pro Well berechnet.

Aufgrund der Tatsache, dass jedes Molekül *N*-ACC nur eine Thiol-Gruppe enthält, konnte die Anzahl der Moleküle und die Anzahl der Thiol-Gruppen pro Well gleichgesetzt werden. Die daraus erhaltenen Wertepaare wurden einer linearen Regression unterzogen, deren Geradengleichung berechnet werden konnte. Anhand der Gleichung konnte die Anzahl der freien Thiole berechnet werden.

3.2.8. Molecular Weight Cut Off (MWCO)-Filtration

Die MWCO-Filtration dient zur Reinigung und Konzentration von Proteinsuspensionen und basiert auf dem Größenunterschied von Proteinen. Im vorliegenden Fall handelte es sich um Antikörper mit einer Masse von rund 150 kDa und kleinere Moleküle von ca. 1 kDa. Die Filter weisen eine Porengröße auf, die Pufferlösungen und kleine Moleküle hindurchtreten lässt, größere Proteine aber zurückhält. Um die nötige Kraft aufzubringen, die benötigt wird, um die Pufferflüssigkeit durch die Poren zu bewegen, werden die Filter zentrifugiert.

Die innerhalb dieser hier beschriebenen Arbeit verwendeten Antikörper haben ein Molekulargewicht von 150 kDa. Aus diesem Grund wurden MWCO-Filter mit einer Porengröße von 50 kDa verwendet, welche die Antikörper sicher zurück halten. Die Filter wurden vor dem ersten Gebrauch mit reinem PBS-Puffer equilibriert. Anschließend wurde ein Probenvolumen von max. 4 bzw. 15 ml, je nach Filtergröße, in das obere Reservoir des Filters übertragen. Bei geringeren Probemengen oder mehrmaliger Filtration wurde das Reservoir entsprechend auf 4 bzw. 15 ml mit PBS aufgefüllt. Der Filter wurde fest verschlossen und für 20 Minuten bei 4.000 x g zentrifugiert.

Nach erfolgter Filtration lag das Eluat im unteren Teil des Filters vor und konnte entnommen werden.

Das Konzentrat befand sich im oberen Reservoir und konnte mit einer Pipette entnommen werden. Die Membran des Filters wurde mit Puffer gespült um den Proteinverlust zu minimieren. Nach dem Gebrauch wurden sowohl der untere als auch der obere Teil des Filters mit Puffer gefüllt um das Austrocknen der Membran zu verhindern. Die Filter wurden so bei 4-8 °C gelagert und mehrmals verwendet.

3.2.9. Konjugation der Antikörper

3.2.9.1. Vorbereitung

Konjugiert wurden 7,5 mg Antikörper in einer Konzentration von 10 mg/ml. Der unspezifische Kontroll-Antikörper UPC-10 lag als Feststoff vor und wurde in 1 ml Diethyldicarbonat (DEPC)-Wasser gelöst. Durch leichtes Schwenken wurde der Antikörper vollständig in Suspension gebracht und für 15 Minuten bei 4-8 °C inkubiert. Anschließend wurden jeweils 500 µl auf einen Spin-X Sterilfilter übertragen und bei 5.000 rpm für 5 Minuten bei RT zentrifugiert.

Bei einer mAb-Konzentration von $11,7 \pm 0,7$ mg/ml wurden 650 μ l entnommen und mit 100 μ l PBS verdünnt um eine Endkonzentration von 10 mg/ml zu erreichen.

Anti-TAC lag als Suspension in einer Konzentration von 2 mg/ml vor. 3,25 ml wurden auf einen MWCO-Filter mit einer Porengröße von 50 kDa übertragen und gemäß dem oben beschriebenen Protokoll konzentriert. 150 μ l des Konzentrats wurden mit 600 μ l PBS-Puffer gemischt um ein Volumen von 750 μ l zu erreichen. Mittels BCA-Test wurde die genaue Konzentration der Antikörpersuspension nach der Verdünnung erneut ermittelt. Die am noch unbehandelten Antikörper vorliegenden freien Thiol-Gruppen wurden mittels Ellman-Test bestimmt.

3.2.9.2. Partielle Reduktion der Antikörper für die Konjugation

Zur Reduktion der Antikörper wurden 7,5 μ l DTT mit einer Konzentration von 100 mM zugegeben um eine finale DTT-Konzentration von 10 mM zu erhalten. Nach ausreichender Durchmischung wurde die Lösung für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Mittels 3-maliger MWCO-Filtration mit jeweils 10 ml PBS (pH 6,0) wurde überschüssiges DTT entfernt. 150 μ l des Konzentrats wurden anschließend mit 750 μ l PBS (pH 6,0) verdünnt.

3.2.9.3. Konjugation

Die jeweilige Menge an TAM-Stocklösung wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt, anschließend wurde die entsprechende Menge der Antikörpersuspension zugegeben. Die Reaktionslösung wurde bei 4°C für 12 h unter ständiger Rotation bei 15 U/min inkubiert.

Nach der Inkubation wurde überschüssiges TAM mittels dreimaliger MWCO-Filtration mit jeweils 3 ml PBS entfernt. Die Konzentrate von jeweils 30 μ l wurden mit 270 μ l PBS verdünnt. Nach der Filtration und Verdünnung erfolgten wiederum ein BCA-Test zur Konzentrationsbestimmung und ein Ellman-Test zur Bestimmung der restlichen freien Thiol-Gruppen.

3.2.9.4. Reaktionsstopp mittels N-ACC

Um restliche, nicht mit TAM besetzte, Thiol-Gruppen zu besetzen, wurde ein 20-facher Überschuss an N-ACC Molekülen zugegeben. Dieser Überschuss bezieht sich erneut auf die 9 freien Thiole an den Antikörpern und entspricht $1,4 \times 10^{18}$ Molekülen N-ACC bzw. 2,3 ml der 1 mM Stocklösung.

Nach Zugabe des entsprechenden Volumens wurde die Reaktionslösung für 5 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde das überschüssige N-ACC durch dreimalige MWCO-Filtration mit 3 ml PBS entfernt. Die Konzentrate von jeweils 30 μ l wurden mit 270 μ l PBS verdünnt. BCA-Test und Ellman-Test dienten wiederum der Konzentrationsbestimmung bzw. der Bestimmung restlicher freier Thiol-Gruppen.

3.2.9.5. Reinigung mittels PD-10-Säule

Für den ersten Reinigungsschritt wurde eine chromatographische Filtrationstechnik verwendet, um Moleküle nach ihrer Größe aufzuteilen. Das PD-10 Kit von GE Healthcare Life Sciences enthält Säulen mit Sephadex G25-Medium, welches Moleküle entsprechend ihrer Größe unterschiedlich schnell durchwandern. Die Durchführung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers.



Abbildung 4: Schematischer Ablauf PD-10-Säule

Die Probe in Form der Antikörper ist Dunkelblau dargestellt.

Modifiziert nach: GE Healthcare, Instructions 52-1308-00 BB

Die Säulen wurden erst mit 15 ml PBS equilibriert und anschließend mit den jeweils 300 µl der zu reinigenden ADC Lösungen überschichtet. Nach vollständiger Aufnahme des Probenvolumens in den Filter wurde dieser nach und nach mit insgesamt 25 ml PBS (pH 7,4) gespült. Das Eluat wurde in 18 Teilfraktionen zu je 1,5 ml aufgefangen. Von jeder Teilfraktion wurden 6 µl entnommen und mittels BCA-Test auf ihren Proteingehalt untersucht. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden in einen MWCO-Filter überführt und konzentriert. Das Konzentrat (40 µl) wurde mit 460 µl PBS verdünnt.

3.2.9.6. Reinigung mittels Protein-A/G-Säule

Die Funktion der Protein-A/G-Säule beruht auf der spezifischen Bindung zwischen den in der Säule enthaltenen bakteriellen Proteinen A und G und den zu reinigenden IgG-Antikörpern. Diese werden auf die Säule aufgebracht und durch die Bindung zu Protein A und G in dieser gebunden. Durch das Spülen der Säule mit einem Puffer mit niedrigem pH-Wert (Elution Buffer) werden die Bindungen wieder gelöst und die Antikörper können im vorgelegten Neutralization Buffer aufgefangen werden. Zur Durchführung wurden die Herstellerangaben umgesetzt. Diese wurden allerdings um die Verwendung weiterer Puffer zum Spülen der gebundenen Antikörper erweitert.

Die bei 2-8 °C gelagerten Säulen und die im Kit enthaltenen Puffer wurden auf RT gebracht. 500 µl der zu reinigenden Probe wurde 1:1 mit Binding Buffer verdünnt.

Nach Equilibrierung mit 15 ml Binding Buffer wurde die Probe auf die Säule aufgebracht und mit weiteren 15 ml Binding Buffer gespült. Zur spezifischen Reinigung wurden anschließend jeweils weitere 15 ml 1M NaCl-Lösung, 0,2 % TWEEN-Lösung und Conjugation Buffer auf die Säule aufgebracht. Die Antikörper wurden anschließend mit 5 ml Elution Buffer von der Säule gelöst und in 1 ml Fraktionen gesammelt. Um den sauren pH des Elution Buffers zu neutralisieren, wurden pro Fraktion 100 µl Neutralisation Buffer vorgelegt. Im Anschluss wurde der Proteingehalt der einzelnen Fraktionen mittels BCA-Test bestimmt. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden wie bereits im Rahmen der PD-10-Säule beschrieben fusioniert.

3.2.9.7. MWCO Filtration mit spezifischen Reinigungslösungen

Im Rahmen dieses Reinigungsschrittes wurde das bereits öfters erwähnte MWCO-Verfahren mehrfach mit den bereits bei der PD-10-Säule verwendeten spezifischen Pufferlösungen wiederholt. 400 µl der ADC-Lösungen wurden auf den MWCO Filter mit einer Porengröße von 50kDa aufgetragen und anschließend mit dem jeweiligen Reinigungspuffer auf 4ml aufgefüllt. Dieser Vorgang wurde jeweils dreimal mit 1M NaCl-Lösung, 0,2% TWEEN-Lösung, Conjugation Buffer und PBS wiederholt. Die gereinigte Antikörper-Suspension wurde in 400 µl PBS aufgenommen.

3.2.9.8. Sterilfiltration

Die jeweils 400 µl der ADC Lösungen wurden in zuvor mit PBS equilibrierten Spin-X Sterilfiltern mit einer Porengröße von 0,45 µl pipettiert und bei RT und 5.000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der gereinigten Konjugate wurden jeweils 6 µl entnommen und mittels BCA-Test vermessen. Anschließend wurde das fertige Konjugat bei 2-8 °C gelagert.

3.2.10. Colony Forming Unit Assay

Die zuvor mittels MACS separierten Stammzellen wurden in 1,5 ml Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) mit 2 % fetalem Kälberserum (FCS) aufgenommen. Nach erfolgter Zellzählung wurde eine Konzentration von 3×10^4 Zellen pro ml eingestellt. 300 µl dieser Zellsuspension wurden anschließend in 5 ml Kulturröhrchen mit jeweils 3 ml MethoCult Medium überführt und mittels Vortex Mischer homogenisiert.

Die Kulturröhrchen wurden 5 min stehen gelassen um die entstandenen Luftblasen entweichen zu lassen, bevor jeweils 1,1 ml der Zellsuspension in 35 mm Kulturplatten übertragen wurden.

Diese 35 mm Kulturplatten wurden in Duplikaten gemeinsam mit einer mit sterilem Wasser gefüllten 35 mm Kulturplatte in einer 100 mm Kulturplatte mit geschlossenem Deckel bei 37 °C und 5% CO₂ für 15 Tage inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurden die Zahl und die Morphologie der Kolonien mittels Lichtmikroskop und 100 mm Kulturplatte mit Raster bestimmt.

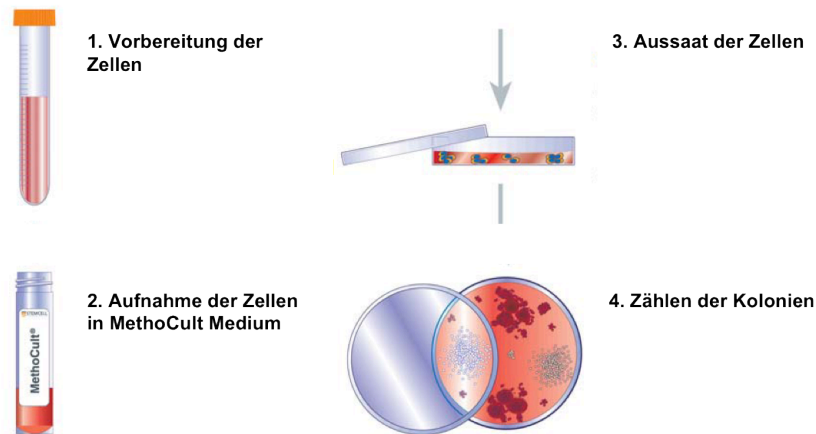


Abbildung 5: Ablauf des CFU Assays

Zwischen Schritt 3 und 4 erfolgt die Inkubation für 15 Tage.

Modifiziert nach: Stem Cell Technologies, Datasheet MethoCult H4034 Optimum

3.2.11. Toxizitätsmessung mittels CFU Assay

Die zuvor mittels MACS separierten Stammzellen wurden in 1,5 ml IMDM Medium mit 2% FCS aufgenommen.

Nach erfolgter Zellzählung wurden zu jeweils 500 µl Zellsuspension 500 µl der Substanz in der jeweiligen Konzentration gegeben und die Ansätze für 8 h inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurden die Zellen in 15 ml Falcons überführt und zweimal mit jeweils 5 ml RPMI Medium bei 1500 rpm und RT für 5 Minuten zentrifugiert. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in 500 µl IMDM Medium mit 2% FCS aufgenommen und erneut gezählt. Gemäß dem Ergebnis der Zellzählung wurde durch Verdünnung mit IMDM Medium mit 2% FCS eine Konzentration von 3×10^4 Zellen pro ml eingestellt. 300 µl dieser Zellsuspension wurde anschließend in 5 ml Kulturröhrchen mit jeweils 3 ml MethoCult Medium überführt und mittels Vortex Mischer homogenisiert.

Die Kulturröhrchen wurden 5 min stehen gelassen um die entstandenen Luftblasen entweichen zu lassen bevor jeweils 1,1 ml der Zellsuspension in 35 mm Kulturplatten übertragen wurden. Diese 35 mm Kulturplatten wurden in Duplikaten gemeinsam mit einer mit sterilem Wasser gefüllten 35 mm Kulturplatte in einer 100 mm Kulturplatte mit geschlossenem Deckel bei 37 °C und 5% CO₂ für 15 Tage inkubiert.

Nach Ende der Inkubation wurde die Zahl und die Morphologie der Kolonien mittels Lichtmikroskop und 100 mm Kulturplatte mit Raster bestimmt.

3.2.12. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie basiert auf Emissionen, welche von Zellen ausgehen, wenn diese einzeln einen Laserstrahl passieren. Die gemessenen Streuwerte erlauben Rückschlüsse auf die Größe und Granularität der Zellen.

Um die Expression von Oberflächenmolekülen auf Zellen zu messen, können diese mittels fluoreszenzgekoppelter Antikörper markiert werden und die jeweiligen Fluoreszenzwerte am FACS vermessen werden.

Zur Durchführung wurden 1×10^5 Zellen aus der Zellkultur entnommen, in polystyrene-round-bottom-tubes in 2 ml FACS-Puffer aufgenommen und für 5 Minuten mit 1800 rpm bei 20 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen im Restpuffer resuspendiert. Zur Markierung mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern wurden 10 µl FCR-Block zugegeben und das Gemisch bei 8 °C und Dunkelheit für 10 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wurden 2 ml FACS-Puffer zugegeben und die Röhrchen erneut wie oben beschrieben zentrifugiert. Das Zellpellet wurde diesmal in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen und die FACS-Antikörper zugegeben. Für die Probe wurde ein Volumen von 2,5 µl (spezifischer Antikörper) eingesetzt, für den Isotypen 1 µl (unspezifischer Antikörper). Nach Inkubation bei 8 °C und Dunkelheit für 10 Minuten wurde erneut, wie oben beschrieben, FACS-Puffer zugegeben und zentrifugiert. Das resultierende Zellpellet wurde dann in 100 µl FACS-Fix resuspendiert und aufgenommen um die Zellen am FACS-Gerät zu vermessen.

3.2.13. Toxizitätsmessungen mittels Durchflusszytometrie

Um die Toxizität von Substanzen zu messen, wurden diese mit den Zellen temporär koinkubiert. Hierfür wurden jeweils $4,8 \times 10^5$ Zellen in 400 µl R10 Medium aufgenommen und mit 400 µl Substanz in der jeweiligen Konzentration verdünnt. Im offenen 15 ml Falcon wurden die Ansätze für 8 h inkubiert und anschließend mit 1500 rpm bei RT für 5 min zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurden die Zellen resuspendiert und erneut in 5 ml R10 Medium aufgenommen. Um die Zellen möglichst vollständig von ungebundenem ADC und Tubulysin zu befreien, wurde der oben beschriebene Zentrifugationsschritt zweimal mit jeweils 5 ml R10 Medium wiederholt. Nach der letzten Resuspendierung des Zellpellets wurden die Zellen in 2 ml R10 Medium aufgenommen und am Zellcounter gezählt. Gemäß der Zählung wurden die Zellsuspensionen durch Verdünnung mit R10 Medium auf eine Konzentration von 1×10^5 Zellen / ml gebracht. Jeweils 1 ml der Zellen wurden dann im 12 Well Format ausplattiert und für weitere 72 h inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen in 5 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und mit 1500 rpm bei RT für 5 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde resuspendiert und erneut in 1 ml FACS-Puffer aufgenommen. Nach einem weiteren 5 minütigen Zentrifugationsschritt bei 1500 rpm und RT wurden die Zellen resuspendiert, in 200 µl FACS Fix aufgenommen und anschließend am FACS-Gerät vermessen.

3.2.14. HPLC

Die HPLC MS-Messungen wurde von TRION Pharma GmbH durchgeführt. Folgendes Gerät und Methoden wurden hierfür verwendet.

Tabelle 4: Gerät und Methode für die Messung der Antikörper und der Konjugate

Mass spectrometer	Agilent 6220 Electrospray time-of-flight (ESI-TOF)
HPLC	Agilent 1200 HPLC system equipped with a diode-array detector, a temperature controlled autosampler and a temperature controlled column compartment
Column	Phenomenex Jupiter C5 column, 250 mm x 2 mm, 5 µm, 300 A
Mobile phase A	Water (0,1 % Trifluoroacetic acid), HPLC grade, Merck
Mobile phase B	Acetonitrile, HPLC grade, J.B. Baker added 0,1 % Trifluoroacetic acid, Merck
Method	INTACT_J_7_01

Tabelle 5: Gerät und Methode für die Messung des Linkermoleküls TAM

Mass spectrometer	Agilent 6330 Electrospray ion trap (ESI-IT)
HPLC	Agilent 1200 HPLC system equipped with a diode-array detector, a temperature controlled autosampler and a temperature controlled column compartment
Column	Phenomenex Jupiter C5 column, 250 mm x 2 mm, 5 µm, 300 A
Mobile phase A	Water (0,1 % Trifluoroacetic acid), HPLC grade, Merck
Mobile phase B	Acetonitrile, HPLC grade, J.B. Baker added 0,1 % Trifluoroacetic acid, Merck
Method	PERMAP_1200_C5_6_01

3.2.15. Statistik

Die Auswertung der Daten erfolgte mittels SPSS und Sigma Plot. Zur Berechnung des p-Wertes wurde der student's t-test durchgeführt. Ein p-Wert von < 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet.

4. Ergebnisse

4.1. CD25 Targetvalidation

Zur Bestimmung der Expression des CD25 Antigens auf leukämischen Blasten wurden gemeinsam mit dem Labor für Leukämiediagnostik des Klinikums der Universität München durchflusszytometrische Daten von 50 Patienten mit AML des Klinikums der Universität München gesammelt und anschließend mittels FlowJo V. 8.8.7 ausgewertet. Als Referenzparameter wurde CD123 gewählt.

CD123, die Alpha Untereinheit des IL-3 Rezeptors, war einer der ersten Marker, für den eine erhöhte Expression auf LSCs beschrieben wurde.³⁰ Die als CD45_{dim} und SSC_{low} definierte Zellfraktion der leukämischen Blasten (Blastengate) wurde entsprechend dieser Eigenschaften in FlowJo ausgewählt. In einem weiteren Auswahlsschritt wurden die CD38_{neg} und CD34_{pos} LSCs definiert.³¹ Über Isotypkontrollen (Autofluoreszenz unmarkierter Zellen) konnte nun eine Aussage zum Anteil der CD25 positiven Zellen innerhalb beider Fraktionen getroffen werden. Hierzu wurde die Mean Fluorescence Intensity (MFI)-Ratio nach folgender Formel berechnet:

$$\text{MFI-Ratio CD25} = \text{MFI CD25 FITC} / \text{MFI Isotyp FITC}$$

Diese LSC-Population musste mindestens 40 Zellen aufweisen, um in die Auswertung einbezogen zu werden. Dies war in 37 der 50 Proben der Fall. Eine positive Antigenexpression der Zellen wurde als MFI-Ratio von > 2 festgelegt. Die untersuchten Patientenproben beinhalteten ausschließlich Daten von Patienten mit AML-Erstdiagnose. Das folgende Schema (Abb. 6) gibt die entwickelte Gatingstrategie für die einzelnen Zellpopulationen noch einmal wieder.

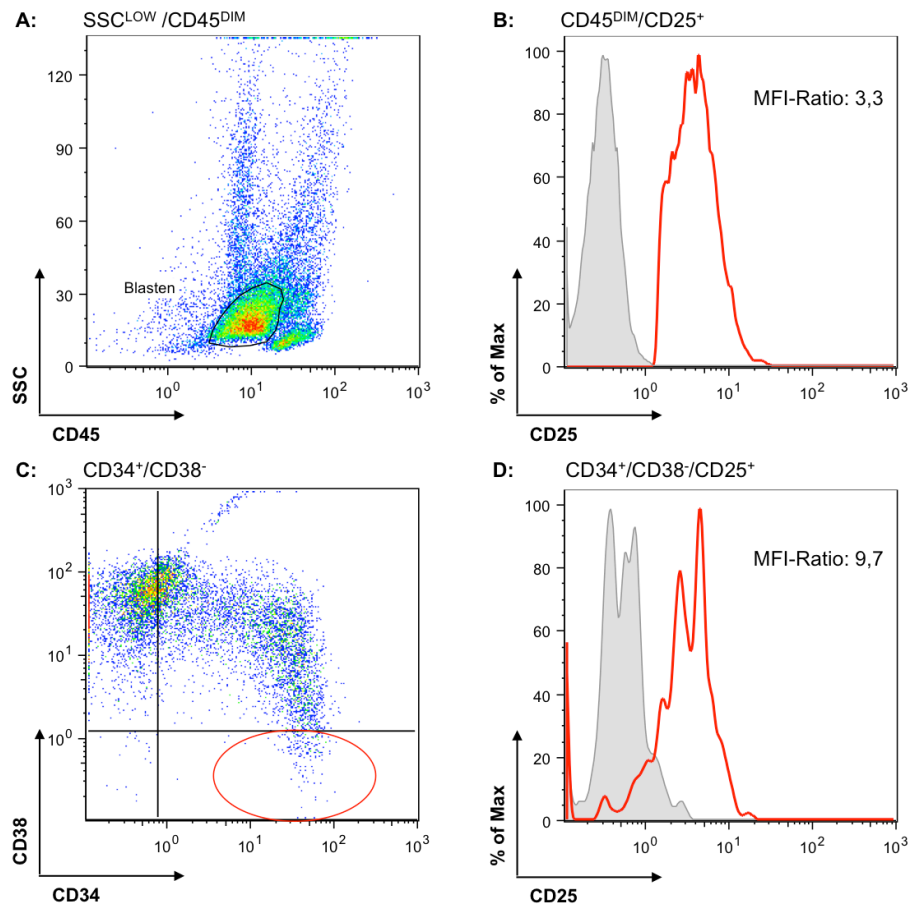


Abbildung 6: Gatingstrategie zur Targetvalidierung

Gezeigt ist das Vorgehen bei der Auswertung der durchflusszytometrischen Daten von 37 Patienten mit AML. A: Blastenanteil. B: CD25 Expression innerhalb der gesamten Blastenpopulation. C: Anteil der CD34⁺CD38⁻ Blasten. D: CD25 Expression der leukämischen Stammzellfraktion. Die Isotypen sind jeweils grau dargestellt. Die MFI-Ratio wurde nach der oben genannten Formel berechnet. Die Auswertung für CD123 erfolgte äquivalent.

Die Auswertung der FACS Daten für CD25 und CD123 auf leukämischen Blasten und LSCs nach dem oben gezeigten Schema lieferte die folgenden Ergebnisse.

Tabelle 6: Patientencharakteristik und Expressionswerte

PT	Alter	Typ	FAB	ELN	CD25-Bulk (MFI-Ratio)	CD25-LSC (MFI-Ratio)	CD123-Bulk (MFI-Ratio)	CD123-LSC (MFI-Ratio)
1	79	ED	M1	<i>intermediate</i>	0,9	0,8	10,1	8,2
2	46	ED	M1	<i>adverse</i>	0,6	0,7	10,3	10,5
3	49	ED	-	-	1,0	0,4	8,3	9,1
4	47	ED	M2	<i>adverse</i>	1,0	0,7	6,2	7,6
5	19	ED	-	-	1,1	0,4	50,5	30,0
6	76	ED	M2	<i>intermediate</i>	2,1	1,4	8,4	4,0
7	53	ED	-	<i>favorable</i>	1,1	0,8	4,2	6,5
8	63	ED	M4	-	1,1	1,9	3,7	12,3
9	54	ED	M1	<i>intermediate</i>	1,8	3,5	32,1	43,0
10	64	ED	M2	<i>adverse</i>	1,0	0,8	12,4	14,5
11	58	ED	M4	<i>intermediate</i>	3,3	9,7	33,7	64,6
12	60	ED	M5	<i>favorable</i>	1,5	3,0	25,2	40,6
13	76	ED	M2	-	0,9	0,4	3,2	2,9
14	72	ED	-	<i>adverse</i>	1,1	0,4	15,0	15,8
15	53	ED	-	<i>adverse</i>	1,0	0,8	3,5	2,6
16	40	ED	M4	<i>intermediate</i>	2,3	10,6	35,1	82,7
17	56	ED	M2	<i>intermediate</i>	1,0	0,8	5,7	3,9
18	66	ED	M1	<i>adverse</i>	1,0	0,5	5,4	1,9
19	44	ED	M3	<i>favorable</i>	1,0	0,7	7,7	6,6
20	68	ED	M4	<i>adverse</i>	0,8	0,7	20,1	17,3
21	72	ED	-	<i>intermediate</i>	1,0	0,5	3,6	5,9
22	30	ED	M6	<i>favorable</i>	1,0	1,7	1,5	3,2
23	57	ED	-	<i>adverse</i>	1,6	0,3	8,1	8,6
24	61	ED	-	<i>intermediate</i>	1,4	1,3	4,0	2,5
25	58	ED	M0	<i>intermediate</i>	0,9	0,7	4,5	7,2
26	83	ED	M2	<i>adverse</i>	2,1	1,9	12,1	8,1
27	61	ED	M4	-	1,0	2,6	15,3	19,3
28	64	ED	-	<i>adverse</i>	1,2	1,5	3,0	10,3
29	23	ED	M4	<i>intermediate</i>	0,9	0,7	18,4	17,5
30	73	ED	M5	<i>intermediate</i>	1,0	1,1	1,3	1,3
31	29	ED	M2	<i>intermediate</i>	0,9	1,0	1,8	1,7
32	23	ED	M1	<i>intermediate</i>	1,0	1,1	6,9	7,4
33	65	ED	-	<i>adverse</i>	0,8	0,6	4,9	4,0
34	81	ED	M0	<i>intermediate</i>	0,3	0,6	4,1	2,2
35	56	ED	M1	<i>adverse</i>	0,8	0,7	4,0	3,2
36	58	ED	M4	<i>intermediate</i>	2,0	4,5	53,1	84,2
37	59	ED	M2	<i>intermediate</i>	1,8	2,4	30,7	35,2

PT, Patient; ED, Erstdiagnose; FAB, French American British, ELN=European Leukemia Net;
MFI=Median fluorescence intensity; LSC, Leukaemic Stem Cells;

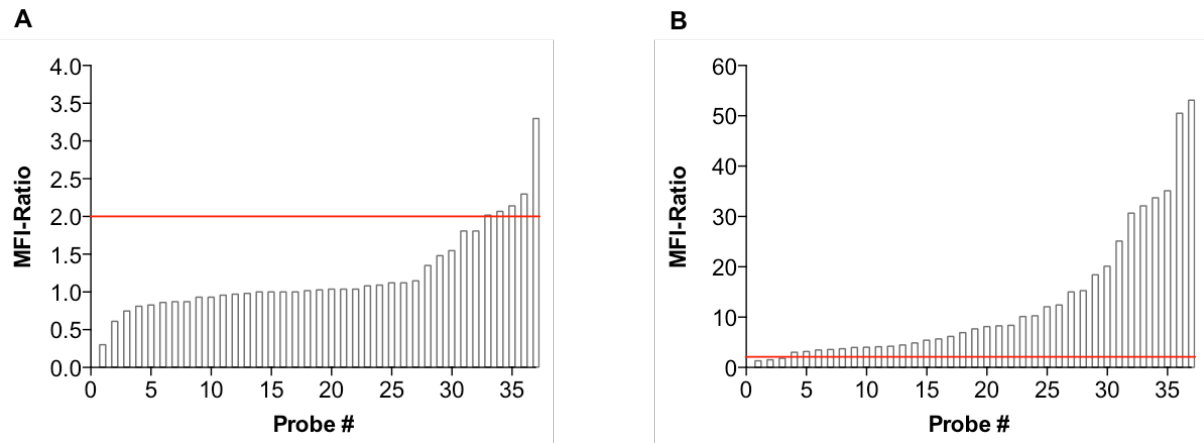


Abbildung 7: CD25 und CD123 Expression auf Blasten

A: Eine positive CD25-Expression der Blastenpopulation konnte in 5 von 37 Fällen gefunden werden. B: CD123 positive Blastenpopulationen wurden in 34 von 37 Fällen gefunden. Die rote Markierung liegt jeweils bei einer MFI-Ratio von 2. Eine MFI-Ratio von > 2 wurde als positiv definiert.

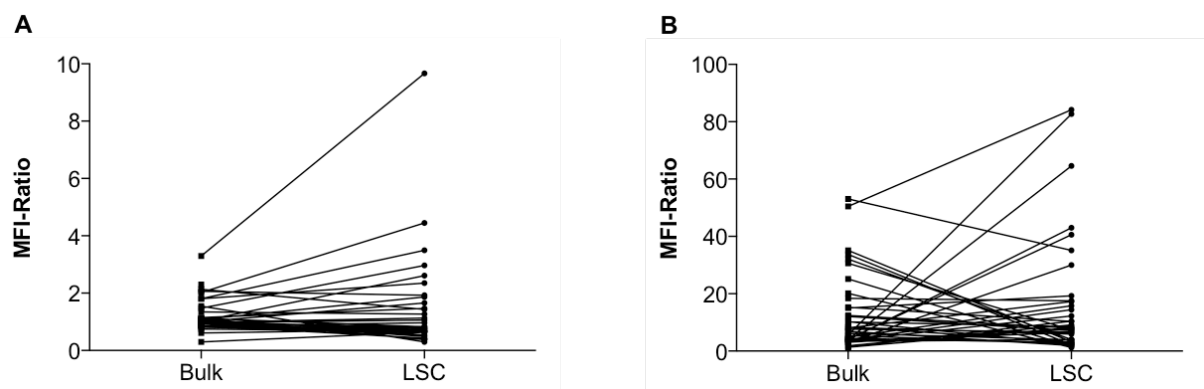


Abbildung 8: CD25 und CD123 auf Blasten (Bulk) und korrespondierenden LSCs

A: MFI-Ratio-Werte für CD25 der Blastenpopulationen (Bulk) sind mit den korrespondierenden LSC-Werten verbunden. B: MFI-Ratio-Werte für CD123 der Blastenpopulationen (Bulk), sowie den korrespondierenden LSC-Werten. $n=37$.

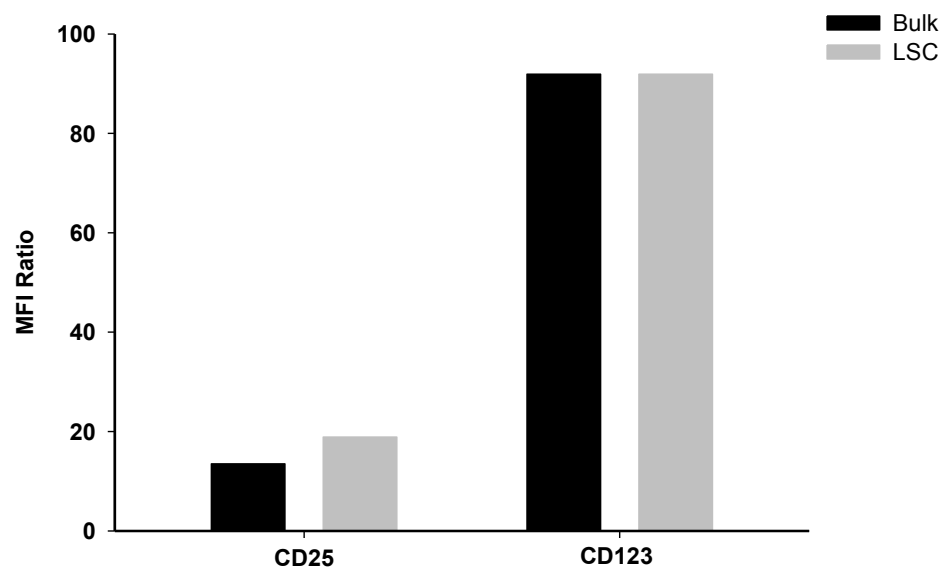


Abbildung 9: CD25 bzw. CD123 positive Blasten (Bulk) und LSCs

Eine als positiv definierte CD25-Expression konnte innerhalb der Blastenpopulation in 13,5 % der Fälle und innerhalb der LSC-Fraktion in 18,9 % der Fälle gefunden werden. CD123 wird in 91,9 % der Fälle auf leukämischen Blasten und in ebenfalls 91,9 % der Fälle auf LSCs exprimiert. n=37.

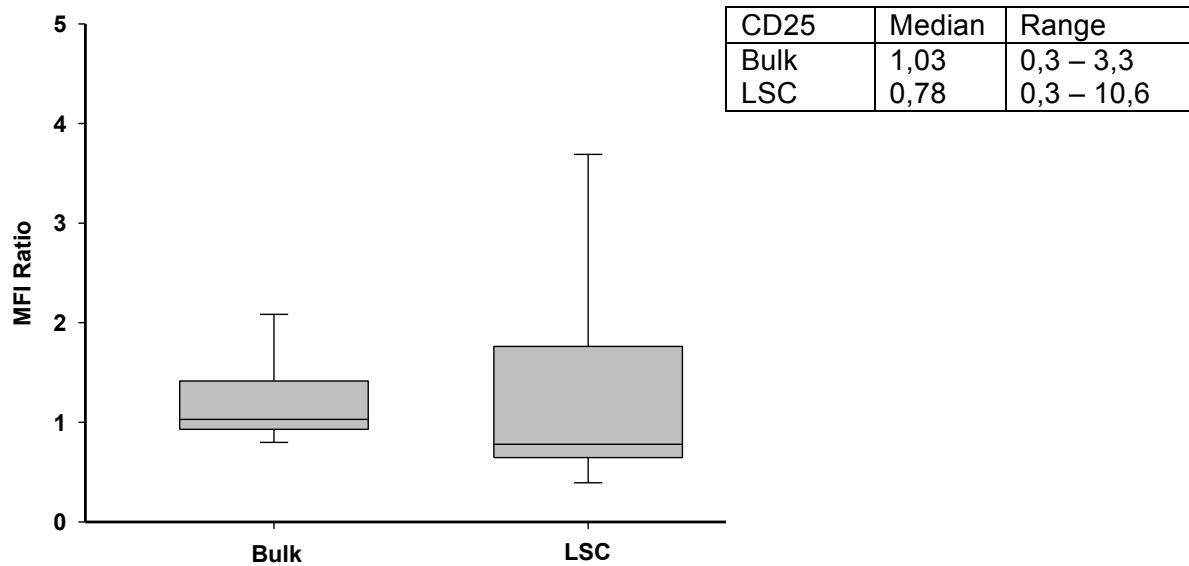


Abbildung 10: MFI-Ratio für CD25 auf Blasten (Bulk) und LSCs

Die Mediane MFI-Ratio liegt für CD25 bei 1,03 bzw. bei 0,78 für LSCs.

Als positiv wurde eine MFI-Ratio von > 2 definiert. $p > 0,05$. $n=37$.

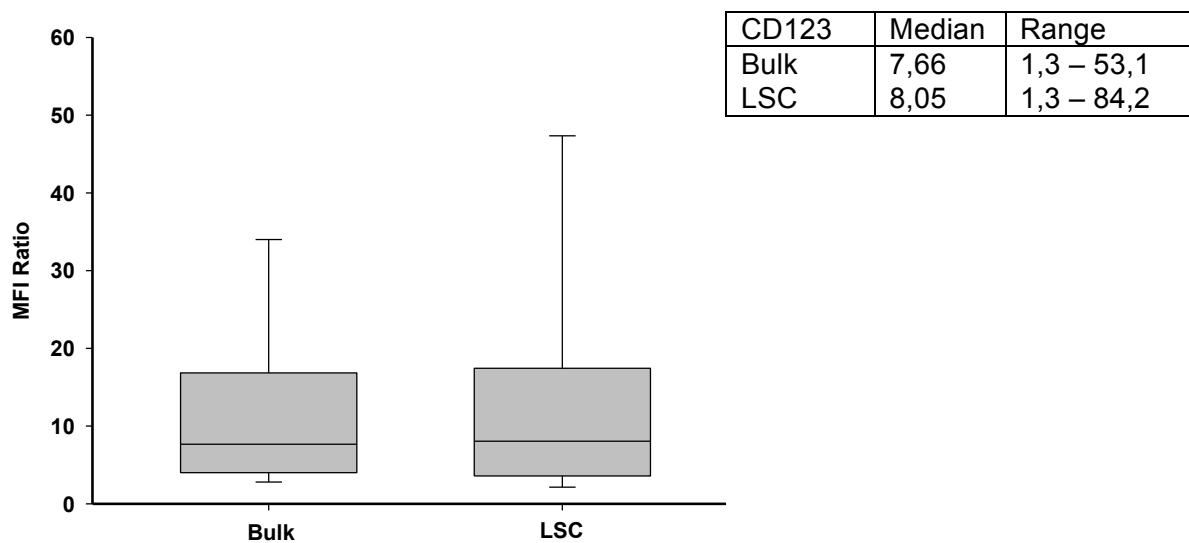


Abbildung 11: MFI-Ratio für CD123 auf Blasten (Bulk) und LSCs

Die Mediane MFI-Ratio liegt für CD123 bei 7,66 bzw. bei 8,05 für LSCs.

Als positiv wurde eine MFI-Ratio von > 2 definiert. $p > 0,05$. $n=37$.

4.2. Etablierung des *in vitro* Systems

4.2.1. CD25-Expression auf den Zelllinien

Um die Eignung der Zelllinien Karpas 299 und OCI für das zu etablierende *in vitro* System zu untersuchen, wurden diese auf die Expression des Oberflächenmoleküls CD25 getestet. Hierzu wurden die Zellen, wie im Methodenteil beschrieben, mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern markiert und anschließend die emittierte Fluoreszenzstrahlung mittels FACScalibur gemessen. Die Auswertung der Daten mittels FlowJo zeigte unten stehendes Ergebnis. (Abb. 12)

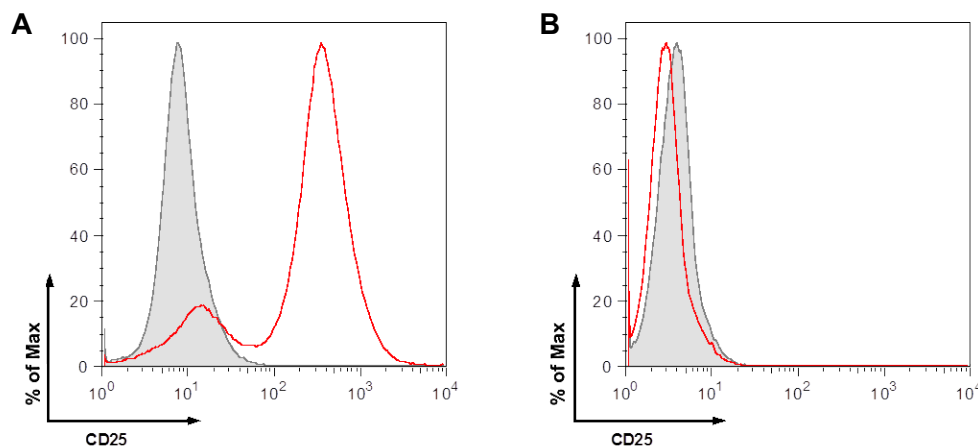


Abbildung 12: CD25-Expression auf Karpas 299 (A) und OCI (B)

Die graue Kurve zeigt jeweils die Isotypen-Kontrolle, die rote Kurve die CD25 Expression. Die MFI-Ratio wurde nach der weiter oben genannten Formel (Seite 27) berechnet.

Die MFI-Ratio für CD25 auf Karpas 299-Zellen beträgt 42 womit diese eine positive Expression zeigen. Auf OCI-Zellen ist die Expression mit einer MFI-Ratio von 2 negativ.

4.2.2. Zytotoxizität des unkonjugierten Anti-TAC Antikörpers

Für die Evaluation der Wirkung des mit Tubulysin konjugierten Antikörpers musste erst die Wirkung des unmodifizierten Antikörpers auf die Zelllinien getestet werden. Um indirekt auch die Internalisierung des Antikörpers in die Zelle zu testen, wurde ein Koinkubationsassay etabliert.

Im Rahmen dieses Versuchs wurden die CD25 positiven Karpas 299 Zellen und die CD25 negativen OCI Zellen 8 h mit verschiedenen Konzentrationen des Antikörpers koinkubiert und anschließend überschüssiger Antikörper durch mehrere Waschschrte entfernt. Nach weiteren 72 h Inkubationszeit wurde die Zellviabilität mittels zellmorphologischer Eigenschaften am FACS gemessen (Abbildung 13).

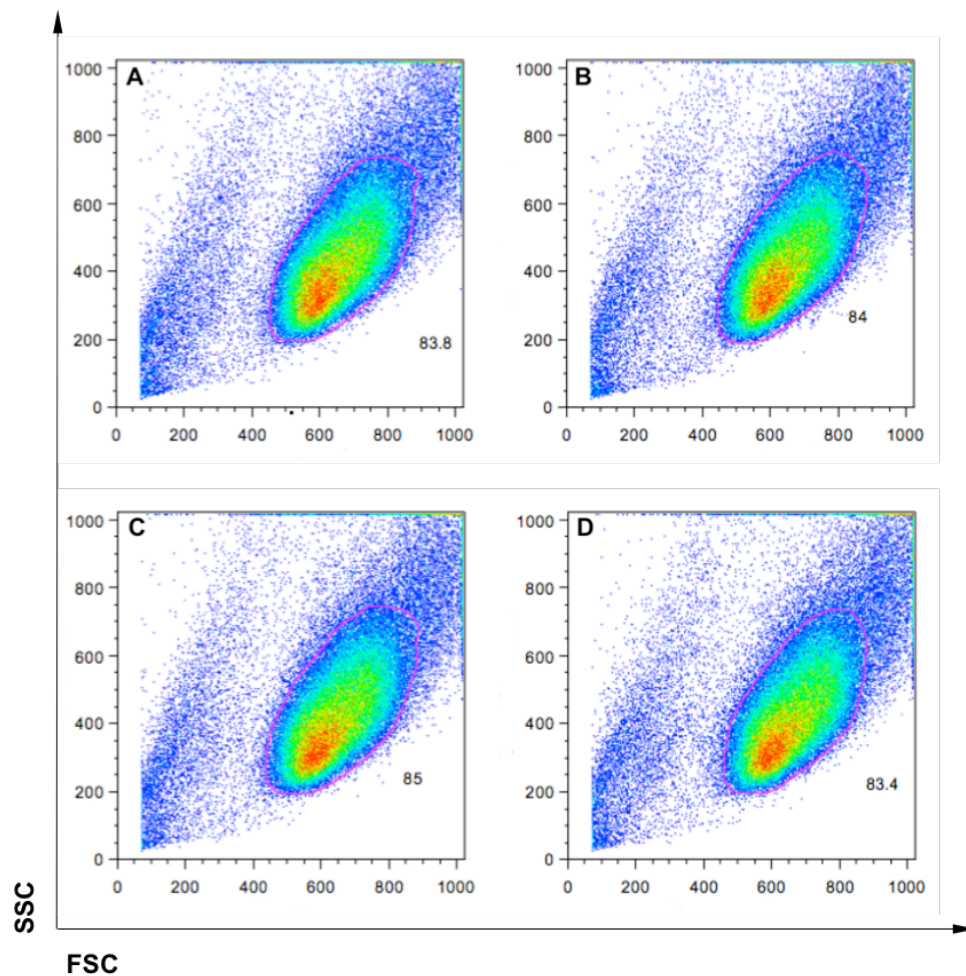


Abbildung 13: Viabilitätsmessung mittels FACS

Gezeigt ist die FlowJo-Auswertung am Beispiel der Koinkubation von unkonjugiertem Anti-TAC Antikörper und CD25 positiven Karpas 299 Zellen. Die als viable Zellen definierten Populationen wurden anhand der morphologischen Kriterien Zellgröße (FSC) und Granularität (SSC) ausgewählt.

A: Kontrolle mit 0 nM AK-Konzentration; B: AK-Konzentration: 1 nM; C: AK-Konzentration: 10 nM und D: AK-Konzentration: 100 nM.

Eine ausführliche Darstellung des Versuchsablaufs findet sich im Methodenteil. Abbildung 14 zeigt die Ergebnisse des Versuchs als Diagramm. Der nahezu deckungsgleiche Verlauf der beiden Wachstumskurven zeigt, dass der Anti-CD25 Antikörper weder auf die CD25 positiven Karpas 299 Zellen noch auf die CD25 negativen OCI Zellen eine erkennbare Wirkung hat. Auf Grund der geringen Materialverfügbarkeit konnten dieser und auch die folgenden Koinkubationsversuche jeweils nur als Einfachansatz durchgeführt werden. Eine Berechnung der Signifikanz war daher nicht möglich.

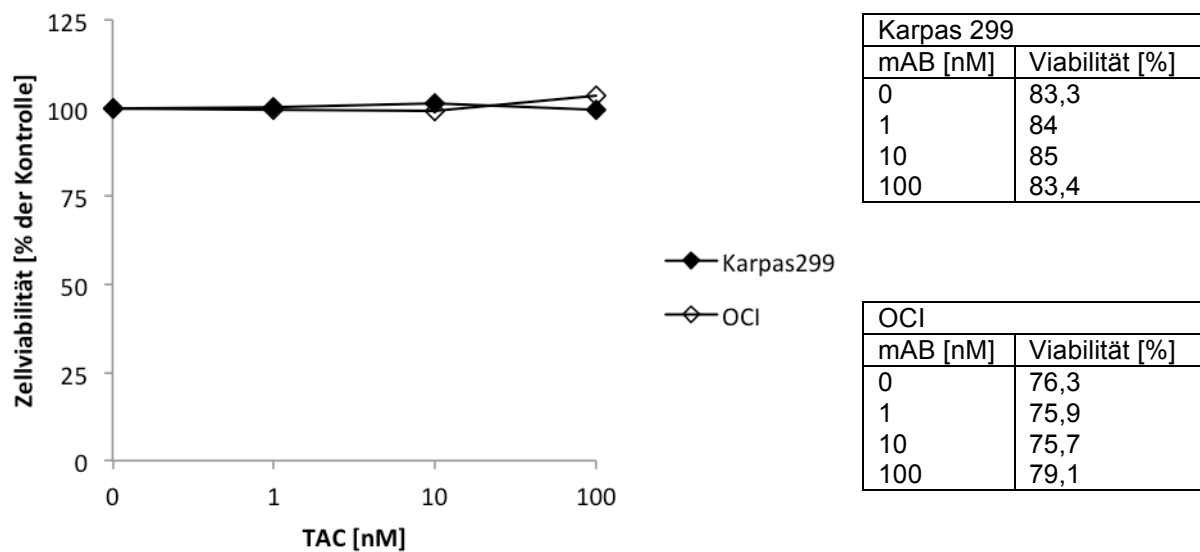


Abbildung 14: *In vitro* Zytotoxizität des Anti-TAC Antikörpers nach 8h Koinkubation

Karpas 299 und OCI Zellen wurden in einer Konzentration von $1,2 \times 10^6$ / ml für 8 h koinkubiert und dann für weitere 72 h inkubiert. Auf der x-Achse ist die Konzentration des Antikörpers aufgetragen. Die y-Achse zeigt die Zellviabilität in Prozent (Einzelwerte), bezogen auf den Maximalwert der Kontrolle.

4.2.3. Zytotoxizität des Tubulysins

Die Wirkung des Tubulysins auf die im Modell verwendeten Zellreihen wurde ebenfalls getestet. Abbildung 15 zeigt das Ergebnis des Versuchs.

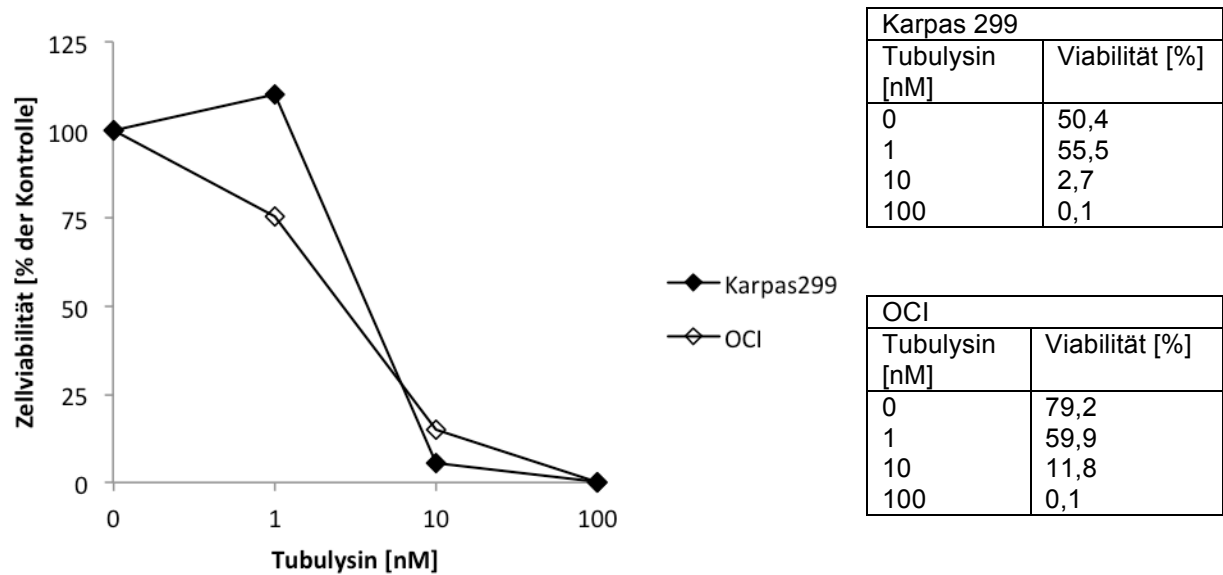


Abbildung 15: *In vitro* Zytotoxizität des Tubulysins mittels FACS nach 8h Koinkubation

Karpas 299 und OCI Zellen wurden in einer Konzentration von $1,2 \times 10^6$ / ml für 8 h koinkubiert und dann für weitere 72 h inkubiert. Auf der x-Achse ist die Konzentration des Tubulysins aufgetragen. Die y-Achse zeigt die Zellviabilität in Prozent (Einzelwerte), bezogen auf den Maximalwert der Kontrolle.

Ergänzend zur durchflusszytometrischen Messung der Wirkung des Toxins Tubulysin auf lebende Zellen wurde deren Enzymaktivität bei verschiedenen Tubulysinkonzentrationen im WST-1-Test gemessen und die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) von $0,45 \pm 0,03$ nM bestimmt.

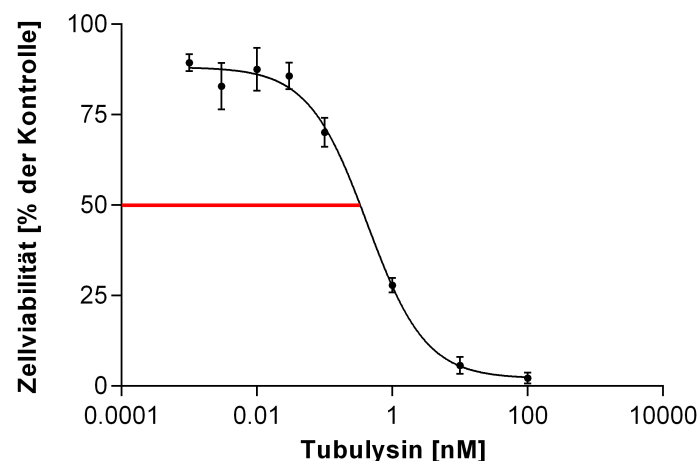


Abbildung 16: *In vitro* Zytotoxizität von Tubulysin im WST-1-Test

Gezeigt ist der sigmoidale Verlauf der Wachstumskurve. Die rote Linie markiert den Bereich der Kurve an dem das Wachstum der Zellen noch 50% des Ausgangswertes beträgt.

Ergänzend wurde die Wirkung des Tubulysins auf hämatopoetischen Stammzellen untersucht. Die HSCs wurden hierzu für 8 h mit Tubulysin A behandelt und anschließend in Methylzellulose-Medium inkubiert. Die Morphologie der während der Inkubationszeit entstandenen Kolonien ist in Abbildung 17 dargestellt. Sie zeigt die vier klassischen Zellreihen, welche bei der Auswertung nach 14 Tagen gefunden wurden. Kolonien wurden dann als solche gezählt, wenn sie aus mindestens 20 Zellen bestanden und deutlich voneinander abgrenzbar waren.

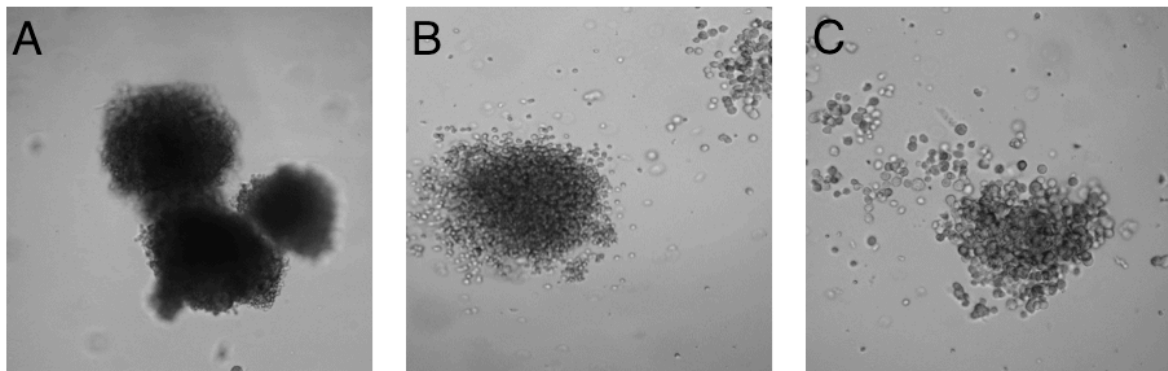


Abbildung 17: Kolonien im CFU-Assay unter dem invertierten Mikroskop

Darstellung der vier häufigsten Kolonietypen in 40-facher Vergrößerung. **A:** BFU-E (Burst forming unit-erythroid), **B** (re.): CFU-M (Colony forming unit-macrophage), **B** (mi.): CFU-G (Colony forming unit-granulocyte), **C:** CFU-GM (Colony forming unit-granulocyte, macrophage)

Abbildung 18 zeigt den Effekt des Tubulysins auf die Stammzellen. Während eine Tubulysinkonzentration von 1 nM keinen Einfluss auf die Entwicklung der Koloniezahl hat, verringert eine Konzentration von 10 nM das Wachstum der Kolonien deutlich.

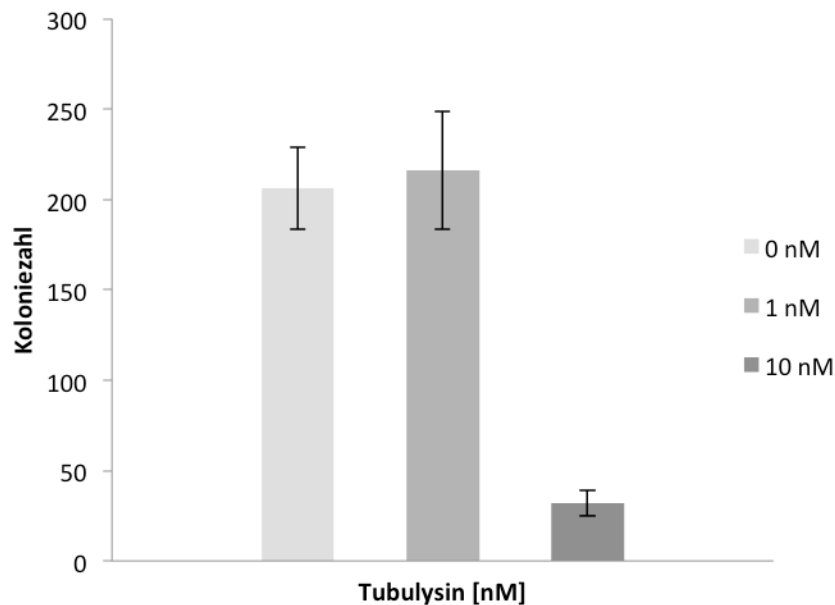


Abbildung 18: *In vitro* Zytotoxizität von Tubulysin auf HSCs

Die zuvor mittels MACS isolierten Stammzellen wurden 8 h mit Tubulysin A behandelt und anschließend 14 Tage inkubiert. Die Auswertung erfolgte durch Auszählung der gewachsenen Kolonien unter dem Mikroskop. Auf der y-Achse ist die jeweilige Gesamt-Koloniezahl aufgetragen, auf der x-Achse die jeweiligen Konzentrationen, mit denen die Zellen behandelt wurden.

Tabelle 7 : Übersicht über die einzelnen Kolonien im CFU-Assay

Ansatz	CFU-G	CFU-M	CFU-GM	BFU-E	Summe
Kontrolle (1)	74	34	34	79	221
Kontrolle (2)	70	19	39	62	190
1 nM (1)	106	24	28	81	239
1 nM (2)	74	11	42	66	193
10 nM (1)	13	0	0	24	37
10 nM (2)	7	1	0	19	27

Bei der Kontrollgruppe mit 0 nM Tubulysin konnten insgesamt 206 ± 23 Kolonien gezählt werden. Die Auswertung der mit 0 nM Tubulysin behandelten Zellen ergab 216 ± 33 Kolonien und nach Behandlung mit 10 nM Tubulysin konnten 32 ± 7 Kolonien gezählt werden.

4.3. Herstellung des Konjugats

4.3.1. Reduzierbare Disulfidbrücken am Antikörper Anti-TAC

Im Rahmen mehrerer Vorversuche wurde das Reduktionsverhalten des Anti-TAC Antikörpers und eines unspezifischen Kontroll-Antikörpers (UPC-10) getestet.

Hierzu wurden die zugänglichen Thiole auf den unbehandelten (nativen) Antikörpern und den mittels DTT reduzierten Antikörpern gemessen. Um zu zeigen, dass die reduzierten Thiole auch tatsächlich wieder besetzt werden können, wurde *N*-ACC in 20-fachem Überschuss zugegeben und wiederum die Anzahl der verbleibenden zugänglichen Thiole an den Antikörpern bestimmt. Um das Ergebnis messen zu können wurde eine Methode etabliert, welche es erlaubt, über die Proteinkonzentration, das Volumen, das Molekulargewicht der eingesetzten Antikörper und die gesamten gemessenen freien Thiolgruppen, die freien Thiolgruppen pro Antikörper zu berechnen. Hierbei lieferte der im Methodenteil ausführlich beschriebene Ellman-Test über eine *N*-ACC Standardkurve (das *N*-ACC Molekül besitzt genau eine SH-Gruppe) die Gesamtzahl der in einer Probe vorhandenen Thiolgruppen und der, ebenfalls im Methodenteil beschriebene, BCA-Test die Proteinkonzentration der eingesetzten Probe. Die Berechnung der freien Thiole pro Antikörper erfolgte nun nach folgender Formel:

$$\text{SH pro AK} = \frac{\text{Gesamtzahl der gemessenen SH}}{(\text{Proteinkonzentration} / \text{Molekulargewicht AK})}$$

Auf nativem Anti-TAC wurden $2 \pm 0,4$ und auf nativem UPC-10 $3 \pm 0,7$ Thiole festgestellt. Durch den Reduktionsprozess konnte diese Anzahl bei Anti-TAC auf $7 \pm 0,6$ und bei UPC-10 auf $9 \pm 0,3$ gesteigert werden. Die Zugabe von 20-fachem Überschuss an *N*-ACC führte bei Anti-TAC zu einer Abnahme der messbaren freien Thiole auf $1 \pm 0,6$ und bei UPC-10 auf $1 \pm 0,4$. (Abbildung 19)

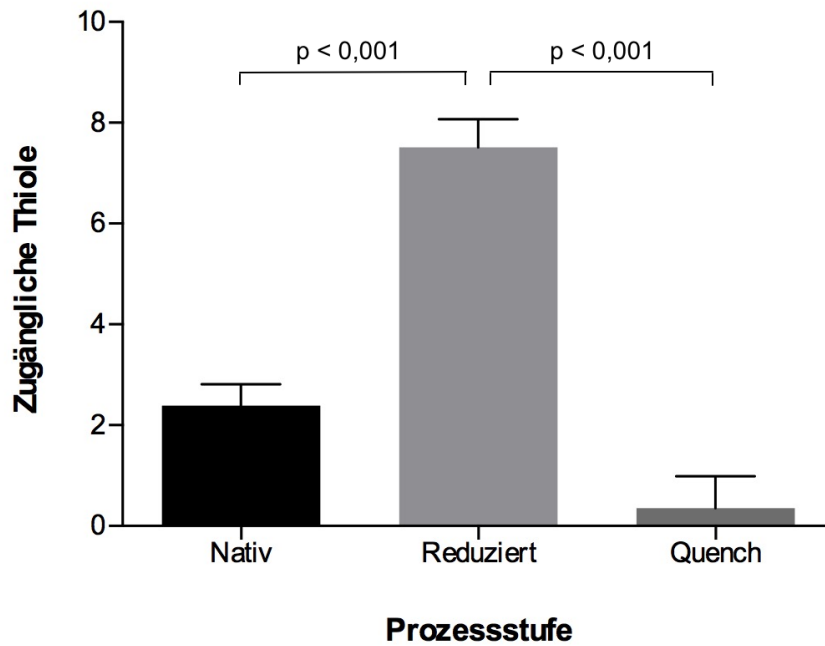


Abbildung 19: Nachweisbare Thiole auf Anti-TAC

Der Antikörper Anti-TAC wurde mittels einer 10 mM DTT Lösung behandelt. Anschließend wurde das DTT entfernt und die Reaktion mit einem 20-fachen Überschuss *N*-ACC beendet (Quench). Auf der x-Achse sind die Prozessschritte aufgetragen. Auf der y-Achse ist die Anzahl der nachweisbaren Thiol-Gruppen aufgetragen.

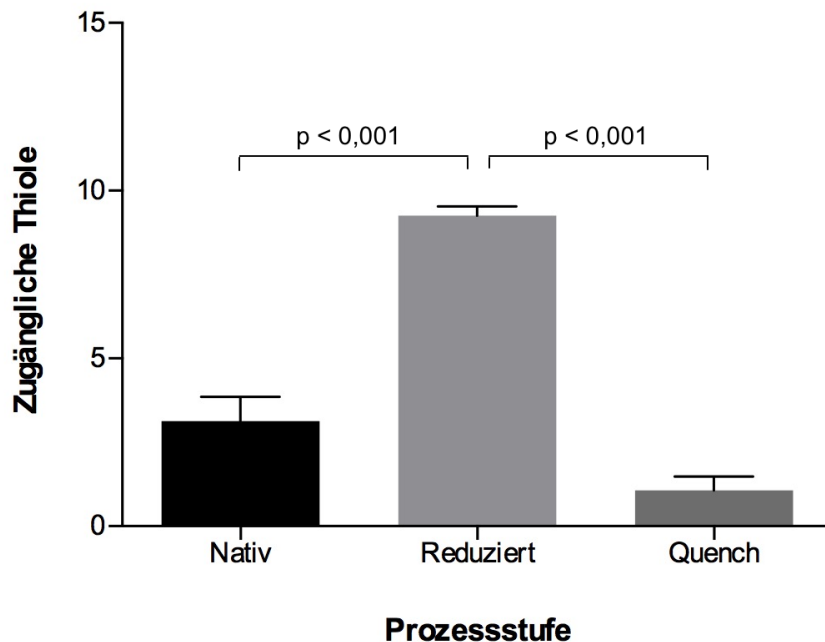


Abbildung 20: Nachweisbare Thiole auf UPC-10

Der Antikörper UPC-10 wurde mittels einer 10 mM DTT Lösung behandelt. Anschließend wurde das DTT entfernt und die Reaktion mit einem 20-fachen Überschuss *N*-ACC beendet (Quench). Auf der x-Achse sind die Prozessschritte aufgetragen. Auf der y-Achse ist die Anzahl der nachweisbaren Thiol-Gruppen aufgetragen.

4.3.2. Prozessplanung

Der eigentliche Konjugationsprozess umfasste drei Schritte, an welche sich später die Reinigung mit weiteren vier einzelnen Reinigungsschritten anschloss. Abbildung 21 gibt einen Überblick über den Versuchsablauf der Konjugation.



Abbildung 21: Versuchsablauf der Konjugation

Gezeigt sind die drei Konjugationsschritte, wobei jedem Schritt eine Probenentnahme vorangeht, um später den Prozess anhand der mAb-Konzentration und der Anzahl an freien SH-Gruppen pro mAb nachvollziehen zu können. Nach jedem Schritt muss eine dreimalige MWCO-Filtration durchgeführt werden, um die hinzugefügten Moleküle (DTT, TAM, N-ACC) aus der Suspension zu entfernen. Diese würden die Messung der Proteinkonzentration und der freien SH-Gruppen an den mAbs stören.

4.3.3. Ausgangsdaten

Die am noch unbehandelten Antikörper vorliegenden freien Thiol-Gruppen wurden mittels Ellman-Test bestimmt.

Tabelle 8 gibt die Messergebnisse der geschaffenen Ausgangslage wieder.

Tabelle 8: Ausgangsdaten für die Reduktion

Antikörper	Volumen [µl]	Konzentration [mg/ml]	Freie Thiole
Anti-TAC	750	10,5 ± 0,2	2 ± 0,4
UPC-10	750	10,8 ± 0,2	3 ± 0,7

4.3.4. Partielle Reduktion der Antikörper

Die Analyse der reduzierten Antikörper mittels BCA- und Ellman-Test zeigte folgendes Ergebnis.

Tabelle 9: Konzentration und freie Thiole der Antikörper nach der Reduktion

Antikörper	Volumen [µl]	Konzentration [mg/ml]	Freie Thiole
Anti-TAC	900	6,9 ± 0,3	9 ± 0,
UPC-10	900	6,4 ± 0,3	16 ± 0,9

4.3.5. Konjugation des TAM-Moleküls an die freien Thiol-Gruppen

Die Konjugation mit TAM erfolgte für jeden Antikörper in drei Ansätzen, um jeweils drei mengenmäßig verschiedene Verhältnisse zu testen. Diese Verhältnisse bezogen sich jeweils auf die freien Thiole der Antikörper und die zugegebenen TAM Moleküle.

Ein Verhältnis von 1:1 bedeutete hierbei, dass jedem freien Thiol auf den Antikörpern genau ein TAM Molekül für eine Bindung zur Verfügung stand. Demzufolge wurden 0,5-, 1-, und 1,5-fache Überschüsse an TAM getestet. Auf Grund der Daten aus dem Vorversuch, welche obenstehend aufgeführt sind, wurde nach der Reduktion von 9 freien Thiolen pro Antikörper ausgegangen. Daher konnten zu den einzelnen Ansätzen mit 280 µl Antikörpersuspension jeweils entweder 3, 6 oder 9 µl der TAM Stocklösung mit 20 mM zugegeben werden.

Tabelle 10 fasst die errechneten Planungsdaten für die oben genannte Berechnung zusammen.

Tabelle 10: Planungsdaten für die Konjugation in drei Ansätzen pro Antikörper

Ansatz	mAb-Volumen [µl]	mAb-Moleküle	mAb-freie Thiole	TAM Volumen [µl]	TAM Moleküle
0.5 UPC-ADC	280	$7,8 \times 10^{15}$	7×10^{16}	3	$3,5 \times 10^{16}$
1.0 UPC-ADC	280	$7,8 \times 10^{15}$	7×10^{16}	6	7×10^{16}
1.5 UPC-ADC	280	$7,8 \times 10^{15}$	7×10^{16}	9	$10,5 \times 10^{16}$
0.5 TAC-ADC	280	$7,8 \times 10^{15}$	7×10^{16}	3	$3,5 \times 10^{16}$
1.0 TAC-ADC	280	$7,8 \times 10^{15}$	7×10^{16}	6	7×10^{16}
1.5 TAC-ADC	280	$7,8 \times 10^{15}$	7×10^{16}	9	$10,5 \times 10^{16}$

Nach der Konjugation und Filtration erfolgten wiederum ein BCA-Test zur Konzentrationsbestimmung und ein Ellman-Test zur Bestimmung der restlichen freien Thiol-Gruppen. Tabelle 11 zeigt die Resultate der einzelnen Konjugations-Ansätze, wobei die Zahlen vor den Bezeichnungen der Antikörper-Konjugate für das Verhältnis, in dem das Linkermolekül TAM bei der Konjugation zugegeben wurde, stehen (s.o.).

Tabelle 11: Konzentration und freie Thiole nach der Konjugation

Antikörper	Volumen [µl]	Konzentration [mg/ml]	Freie Thiole	Drugload
0.5 UPC-ADC	300	$4,7 \pm 0,2$	$5 \pm 2,0$	11
1.0 UPC-ADC	300	$4,6 \pm 0,1$	$8 \pm 0,7$	8
1.5 UPC-ADC	300	$4,5 \pm 0,1$	$7 \pm 1,0$	9
0.5 TAC-ADC	300	$5,3 \pm 0,3$	$3 \pm 1,3$	6
1.0 TAC-ADC	300	$4,8 \pm 0,1$	$7 \pm 0,7$	2
1.5 TAC-ADC	300	$4,9 \pm 0,0$	$3 \pm 1,0$	6

Der Drugload wurde als mittlerer Drugload aus der Differenz der freien Thiole vor und nach der Konjugation berechnet. Um restliche, nicht mit TAM besetzte, Thiol-Gruppen zu besetzen, wurde ein 20-facher Überschuss an *N*-ACC Molekülen zugegeben. Dieser Überschuss bezieht sich erneut auf die 9 freien Thiole an den Antikörpern. BCA-Test und Ellman-Test dienten wiederum der Konzentrationsbestimmung bzw. der Bestimmung restlicher freier Thiol-Gruppen. Tabelle 12 zeigt die Resultate der einzelnen Konjugations-Ansätze.

Tabelle 12: Konzentration und freie Thiole nach Quench mit 20-fachem Überschuss *N*-ACC

Antikörper	Volumen [μ l]	Konzentration [mg/ml]	Freie Thiole
0.5 UPC-ADC	300	$4,1 \pm 0,1$	$2 \pm 0,7$
1.0 UPC-ADC	300	$3,1 \pm 0,2$	$4 \pm 0,4$
1.5 UPC-ADC	300	$4,3 \pm 0,1$	$1 \pm 0,4$
0.5 TAC-ADC	300	$4,2 \pm 0,2$	$2 \pm 0,2$
1.0 TAC-ADC	300	$4,2 \pm 0,1$	$1 \pm 0,6$
1.5 TAC-ADC	300	$3,9 \pm 0,1$	$1 \pm 1,0$

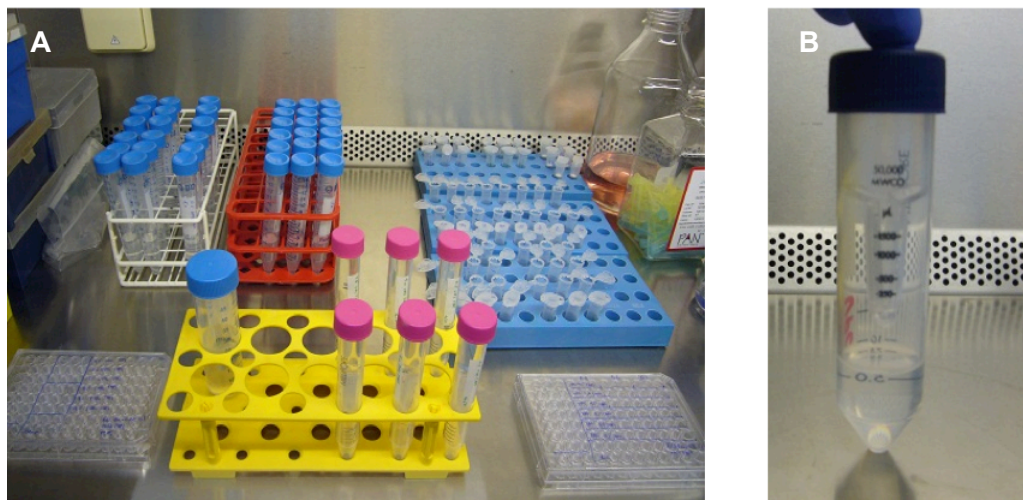


Abbildung 22: Foto der Versuchsanordnung (A) und eines MWCO-Filters (B) nach erfolgter Zentrifugation.

Nachdem, wie Tabelle 11 zeigt, bei der Konjugation kein Zusammenhang zwischen dem Verhältnis von Antikörper und zugegebenen TAM Molekülen erkennbar war, wurden die jeweiligen Ansätze (0,5-, 1-, 1,5-facher Überschuss TAM) mittels MWCO-Verfahren vereint. Tabelle 13 zeigt die Ergebnisse der Messungen nach der Vereinigung und damit das Ergebnis der Konjugation.

Tabelle 13: Ergebnis der Konjugation

TAC-ADC		UPC-ADC	
Volumen [μ l]	Konzentration [mg/ml]	Volumen [μ l]	Konzentration [mg/ml]
300	$23,9 \pm 0,2$	300	$19,7 \pm 0,4$

4.3.6. Reinigung der Konjugate

Um die Konjugate vollständig von nicht-kovalent gebundenen Molekülen zu reinigen, wurden drei verschiedene Reinigungsschritte durchgeführt. Untenstehend sind die Ergebnisse der PD-10-Säule dargestellt.

Tabelle 14: Proteinhaltige PD-10 Eluatfraktionen

TAC-ADC		UPC-ADC	
Elutionsfraktion	Konzentration [mg/ml]	Elutionsfraktion	Konzentration [mg/ml]
E3	1,54	E3	0,76
E4	0,09	E4	1,61
-	-	E5	0,06

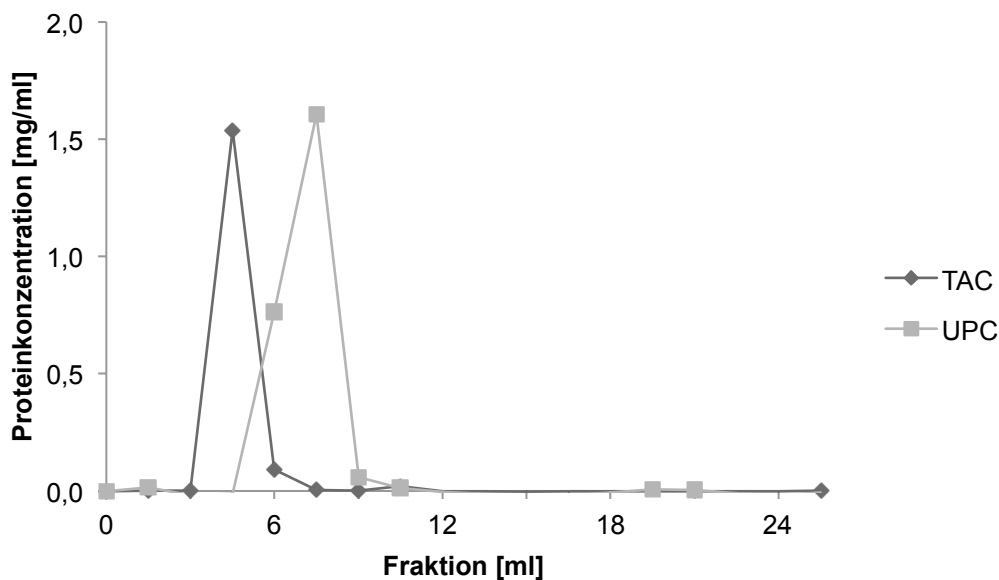


Abbildung 23: Proteinmessungen der einzelnen Eluat-Fraktionen

Die einzelnen Fraktionen wurden wie oben beschrieben auf Protein untersucht. Die Ausschläge der beiden Kurven zeigen die Fraktionen in denen Antikörper nachgewiesen werden konnten.

Die proteinhaltigen Fraktionen E3 und E4 für TAC-ADC und E3, E4 und E5 für UPC-ADC wurden mittels des im Methodenteil beschriebenen MWCO-Verfahrens fusioniert.

Die zweite Reinigungsstufe erfolgte mittels Protein-A/G-Säule. Hierbei sollten die Konjugate in einer Säule gebunden werden, um sie nach der Behandlung mit verschiedenen Reinigungslösungen wieder aus den Säulen zu lösen und aufzufangen. Die Testung der einzelnen Fraktionen auf vorhandenes Protein zeigt ähnlich wie bei dem oben genannten Schritt der PD-10-Säule den unmittelbaren Erfolg des Verfahrens.

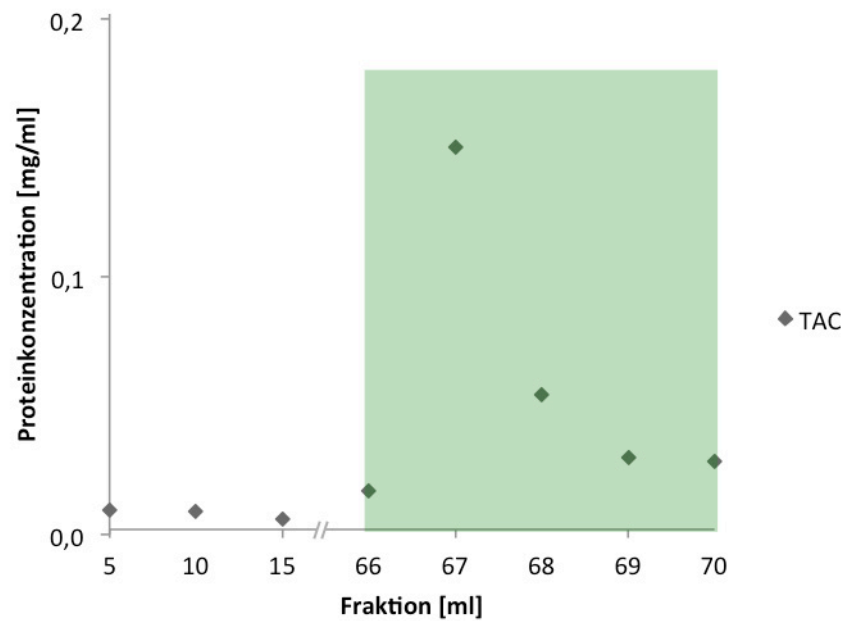


Abbildung 24: Proteinmessungen der einzelnen Eluatfraktionen des TAC-ADCs

Die grüne Fläche stellt den Erwartungsbereich für den Anstieg der Proteinkonzentration nach Zugabe des Elution-Buffers dar, welcher die AK aus der Säule lösen soll.

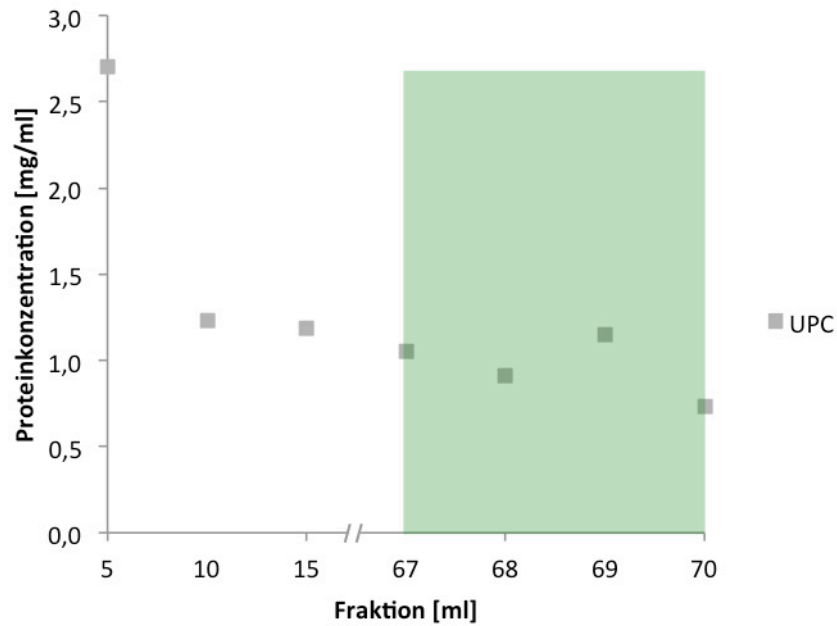


Abbildung 25: Proteinmessungen der einzelnen Eluatfraktionen des UPC-ADCs

Die grüne Fläche stellt den Erwartungsbereich für den Anstieg der Proteinkonzentration nach Zugabe des Elution-Buffers dar, welcher die AK aus der Säule lösen soll. Der Peak der Proteinkonzentration bei 5 ml zeigt, dass das Konjugat nicht wie erwartet in der Säule gebunden hat, sondern bereits mit der ersten Pufferzugabe aus der Säule gelöst wurde.

Nachdem das UPC-ADC nicht wie zu erwarten innerhalb der Säule gebunden hatte (siehe Abbildung 25), wurden die ersten 3 Fraktionen nach dem Auftragen des Konjugats auf die Säule sowie sämtliche Fraktionen nach dem Aufbringen des Elution Buffers gemäß der weiter oben beschriebenen Technik fusioniert.

Der letzte Reinigungsschritt erfolgte mit den im Materialteil aufgeführten Reinigungslösungen mittels MWCO-Verfahren und Sterilfiltration. Nach Abschluss der Reinigung konnten folgende Ergebnisse gemessen werden.

Tabelle 15: Volumen und Proteinkonzentration der fertigen Konjugate

TAC-ADC		UPC-ADC	
Volumen [µl]	Konzentration [mg/ml]	Volumen [µl]	Konzentration [mg/ml]
400	4,3 ± 0,0	300	3,4 ± 0,0

Nach Abschluss des Herstellungs-und Reinigungsprozesses lagen also 1,72 mg TAC-ADC und 1,02 mg UPC-ADC für die Testung vor.

4.4. Testung des Konjugats

4.4.1. Drugload und Reinheit der hergestellten ADCs

Der Drugload und die Reinheit der hergestellten Konjugate wurden mittels Massenspektrometrie und HPLC vermessen. Im Rahmen der Messung konnte gezeigt werden, dass der TAC Antikörper an der Hinge Region gespalten wurde. 28% der Spaltprodukte tragen zwei TAM Moleküle, während 72 % keinen Drugload aufweisen. Freie TAM Moleküle mit einem Molekulargewicht von 1001 kDa konnten nicht nachgewiesen werden, was für die Reinheit der Lösung und den Erfolg der Reinigungsmethoden spricht. Abbildung 26 zeigt das Ergebnis der Messungen für das TAC-ADC.

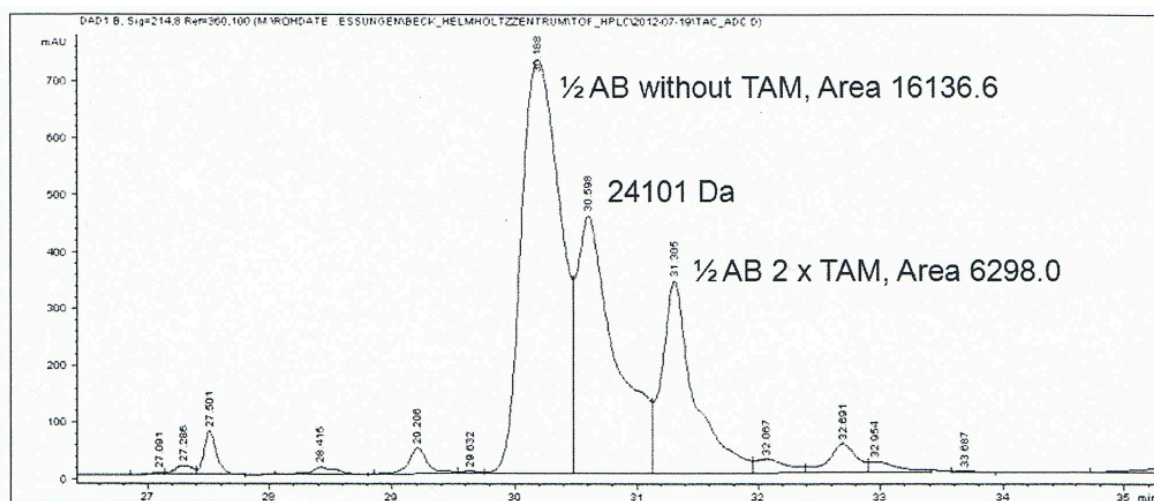


Abbildung 26: HPLC Daten des TAC-ADCs

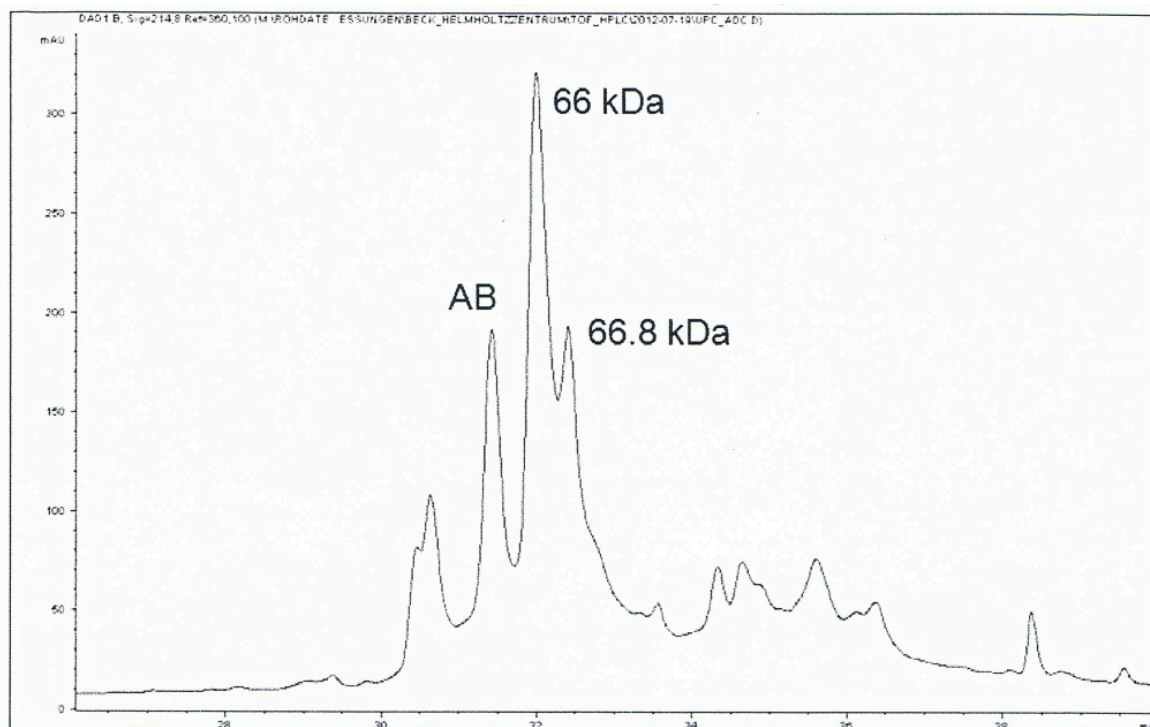


Abbildung 27: HPLC Daten des UPC-ADCs

Die HPLC Messung des unspezifischen UPC-ADCs zeigt einen intakten Antikörper ohne Modifizierung. Außerdem wird ein Signal bei 66 kDa registriert. Es konnte in der Probe kein konjugierter Antikörper nachgewiesen werden. Das 66 kDa Signal konnte nach Rücksprache mit dem Hersteller des Antikörpers am ehesten murinem Albumin zugeordnet werden. Dieses murine Albumin ist aller Wahrscheinlichkeit nach für das Versagen der Konjugation und der Protein-A/G-Säule verantwortlich. Nachdem aus den oben genannten Gründen nun kein sauberes UPC-Konjugat zur Verfügung stand, wurden die weiteren Versuche mit UPC-10 eingestellt.

4.4.2. *In vitro* Toxizitätsmessungen des TAC-ADCs

Die Wirkung der ADC wurde durch Koinkubation mit der CD25 positiven Zelllinie Karpas 299 und der CD25 negativen Zelllinie OCI mit den ADCs untersucht. Die Zellen wurden jeweils für 8 h mit ADC Konzentrationen zwischen 1 nM und 100 nM behandelt und anschließend für weitere 72 h inkubiert. Die Zellviabilität nach der Inkubation wurde im FACS mittels Größe und Granularitätskriterien der Zellen bestimmt (Abbildung 28).

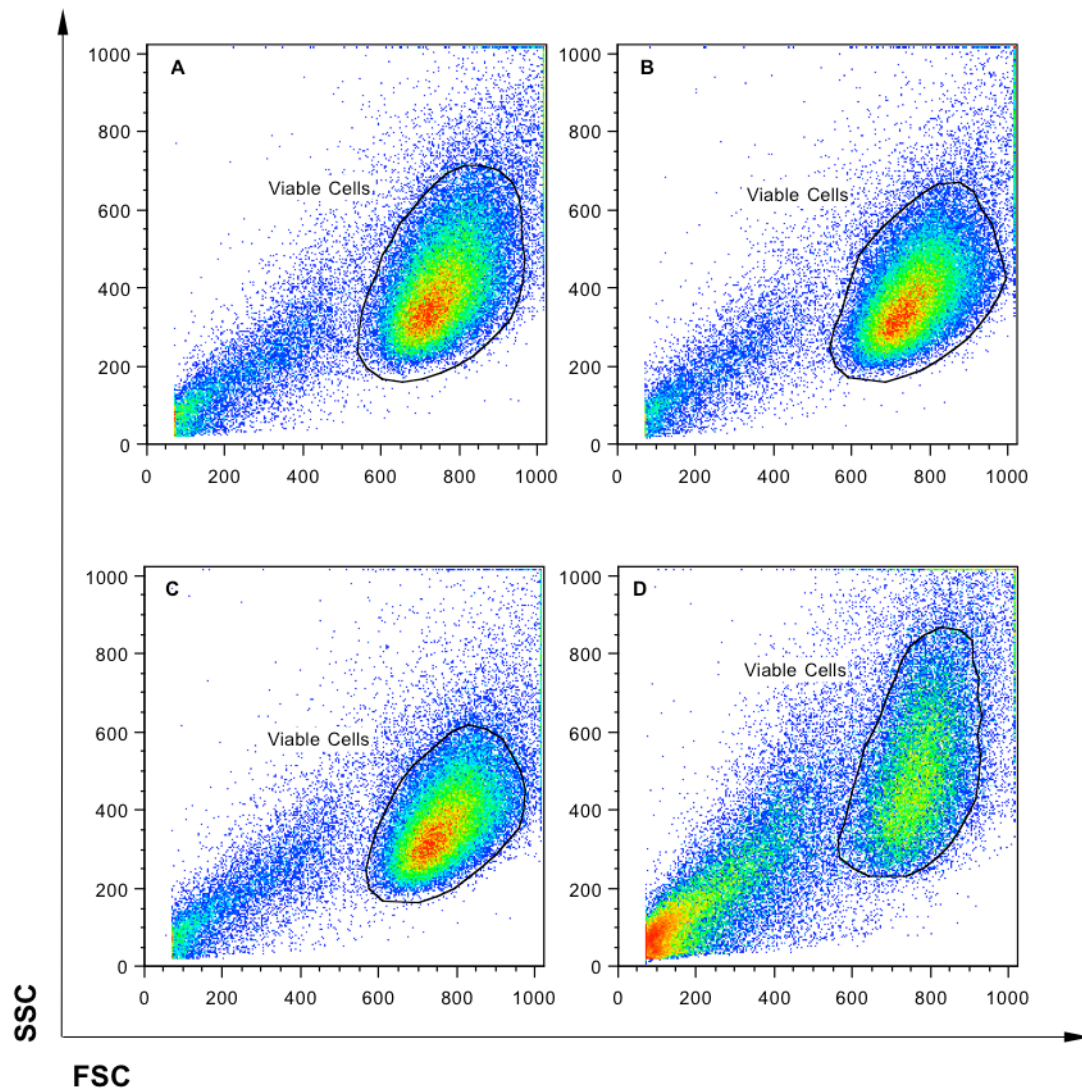


Abbildung 28: *In vitro* Zytotoxizität des TAC-ADCs nach 8 h Koinkubation mit Karpas 299

Viabilität der zuvor mit TAC-ADC behandelten Zellen. Bilder A bis D zeigen die Konzentrationen 0 nM, 1 nM, 10 nM und 100 nM auf CD25 positiven Karpas 299 Zellen. Bild D (100 nM ADC auf CD25 positiven Karpas 299 Zellen) zeigt eine deutliche Abnahme der Zellviabilität.

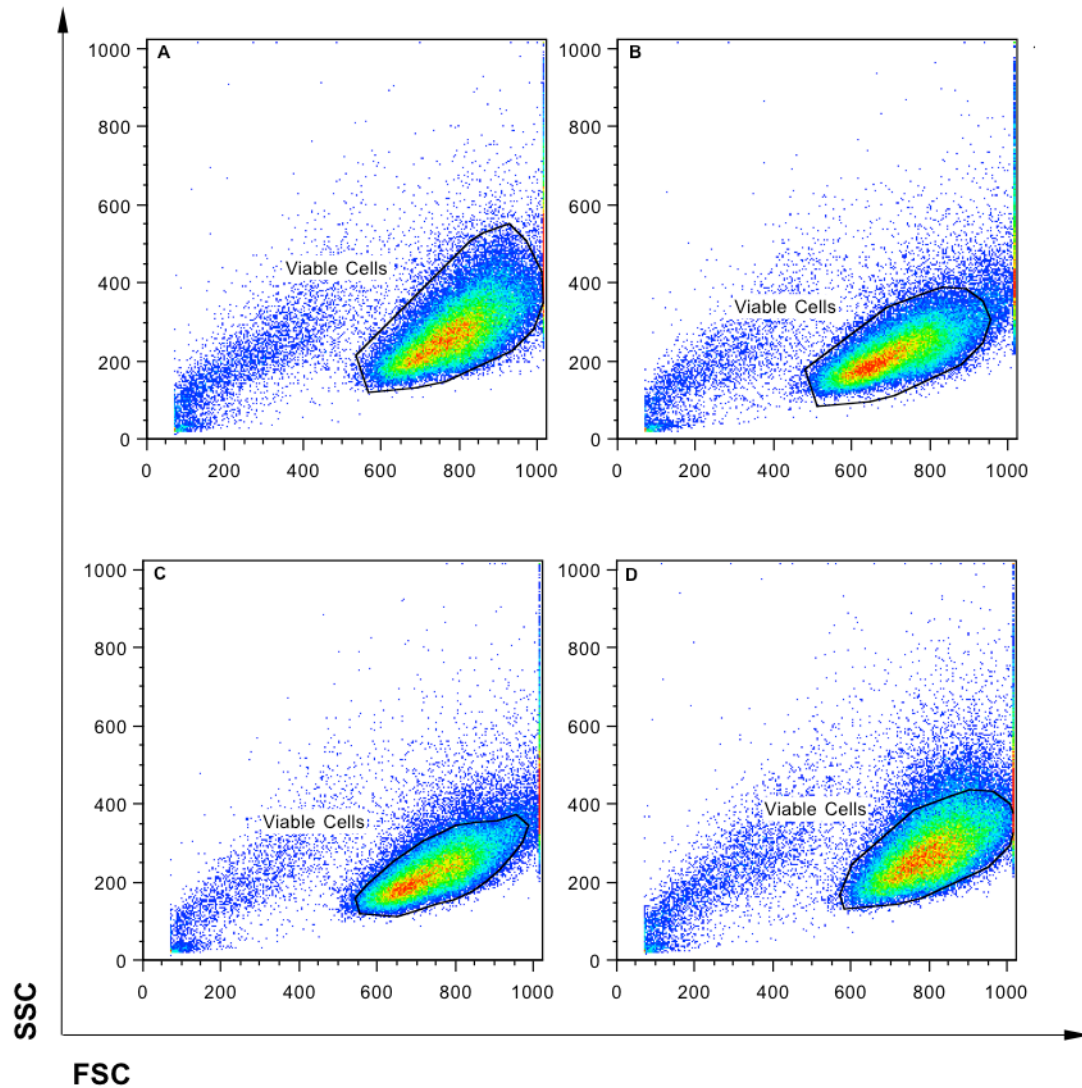


Abbildung 29: *In vitro* Zytotoxizität des TAC-ADCs nach 8 h Koinkubation mit OCI

Die Bilder A bis D zeigen die TAC-ADC-Konzentrationen 0 nM, 1 nM, 10 nM und 100 nM auf CD25 neg. OCI Zellen.

Abbildung 30 zeigt einen Einbruch der Viabilitätskurve der CD25 positiven Karpas 299 Zellen zwischen 10 nM und 100 nM. Dieser Einbruch um mehr als 50 % deutet auf die zytotoxische Wirkung des ADC hin. Die Kurve, welche die Viabilität der CD25 negativen OCI Zellen zeigt, verläuft in diesem Bereich nahezu konstant, wobei die Viabilität gegenüber der Kontrollgruppe um lediglich 4 % abnimmt. Dieser unterschiedliche Effekt deutet auf die erwartete Antigen-spezifität des ADC hin.

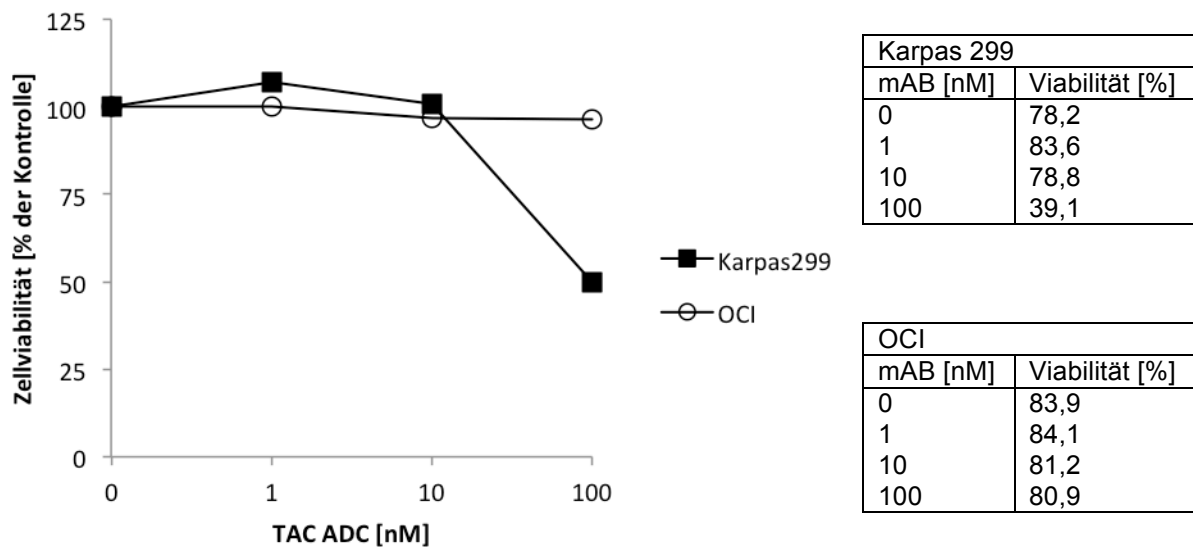


Abbildung 30: *In vitro* Zytotoxizität des TAC-ADCs nach 8 h Koinkubation

Die Viabilität der zuvor mit dem TAC-ADC behandelten Zellen wurde mittels FACS vermessen. Auf der y-Achse ist die Viabilität im Verhältnis zur Kontrolle (kein ADC) aufgetragen (Einzelwerte). Die x-Achse zeigt die jeweilige ADC Konzentration. Die Antgenspezifität wird durch den selektiven Einbruch der Viabilität um 50% des Ausgangswertes der CD25 positiven Karpas 299 Zellen gezeigt.

5. Diskussion

5.1. CD25 – ein geeignetes Ziel?

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde zunächst die Expression von CD25 auf leukämischen Blasten und LSCs anhand der MFI-Ratio evaluiert. In 13,5 % der Fälle wurde eine Expressionsintensität der Blastenpopulation von > 2 detektiert. Bei der Betrachtung der korrespondierenden LSCs war der Anteil mit 18,9 % sogar etwas höher. Diese überäquivalente Expressionsintensität macht CD25 in diesem Zusammenhang zu einer geeigneten Zielstruktur für ADCs. Im Vergleich zur CD123 Expression war der Anteil der exprimierenden Zellen verhältnismäßig gering, lag jedoch nur leicht unterhalb des Ergebnisses von Saito et al., die bei 24,6% der LSCs eine positive Expression beobachteten konnten und eine MFI ab 800 als positiv definierten.²⁵

Doch auch auf Grundlage anderer wissenschaftlicher Arbeiten scheint die Expression von CD25 im Rahmen der AML von wichtiger Bedeutung. So wurde in einer Vielzahl von Arbeiten gezeigt, dass es sich bei CD25 um einen sowohl in der Prognose als auch in der Therapie einsetzbaren und wertvollen Stammzellmarker handelt,³²⁻³⁷ da die CD25 Expression auf leukämischen Blasten zum einen mit dem Gesamtüberleben und Rezidivfreiem Überleben^{32,38} und zum anderen mit der minimalen Resterkrankung nach Chemotherapie korreliert.^{33,37,38} Im Vergleich zu anderen bei AML eingesetzten Stammzellmarkern wie CD123, CD96 oder CD47 liegt die Bedeutung der CD25 Expression vor allem darin, dass es im Gegensatz zu diesen nicht von gesunden HSC exprimiert wird.^{36,39-41} Die physiologische Hämatopoese bliebe daher bei einer gegen CD25 gerichteten Therapie verschont. Ein weiterer Vorteil von CD25 ist die fehlende Expression außerhalb des hämatopoetischen Systems. So weisen andere Stammzellmarker wie CD47 und CD44 eine breite Expression im Körper auf, die bei einer gegen sie gerichteten Therapie dazu führen könnte, dass auch andere Organe Schaden nehmen würden.³⁵ Neben CD25 scheint es sich vor allem bei CD32 um einen weiteren potentiellen Stammzellmarker zu handeln, der ebenfalls keine Expression auf gesunden HSCs zeigt. Ein Nachteil könnte jedoch durch die Expression auf B-Zellen, T-Zellen und Monozyten, wie den Alveolarmakrophagen der Lunge, entstehen. Trotz dessen scheinen sowohl CD25 als auch CD32 exprimierende ruhende LSCs eine große Rolle im Rahmen der Erkrankung zu spielen. Dies konnte vor allem durch die Beobachtung bestätigt werden, dass mittels Transplantation CD25 oder CD32 positiver Zellen von AML Patienten die Erkrankung in Mäusen initiiert werden kann.³⁶

Ein weiterer positiver Nebeneffekt einer gegen CD25 gerichteten Therapie könnte in der Zerstörung T-regulatorischer Lymphozyten (Treg) liegen, die ebenfalls CD25 exprimieren. Treg haben normalerweise die Aufgabe, autoimmunen Prozessen im Körper vorzubeugen und die physiologischen Reaktionen des Immunsystems zu regulieren.

Im Rahmen eines malignen Tumors erscheinen diese Zellen jedoch hinderlich, da sie eine Immunantwort des Körpers gegen die Tumorzellen verhindern.⁴²

Doch häufig sind eben diese Zellen bei malignen Tumorerkrankungen erhöht und korrelieren mit einer schlechteren Prognose.⁴³⁻⁴⁵ Ein wesentlicher Mechanismus scheint hier die Beeinträchtigung zytotoxischer T-Zellen (CD8 positive Zellen) durch Treg zu sein, wodurch die Tumorzellen dem Immunsystem entgehen und ungehindert wachsen können.⁴⁴ Aber auch B-Zellen, natürliche Killerzellen sowie dendritische Zellen werden mit dem gleichen Ergebnis durch Treg in ihrer Funktion gestört.⁴⁶⁻⁴⁸ Diese Beobachtungen werden durch Arbeiten bestätigt, die zeigen, dass eine begleitende, gegen Treg gerichtete Therapie, das Ansprechen verschiedenster Therapieansätze bei malignen Tumoren verbessert.⁴⁹⁻⁵² So erzielte beispielsweise eine auf dendritischen Zellen basierende Impfung gegen AML im Mausmodell bei gleichzeitiger Therapie mit Anti-CD25 Antikörpern gegen Treg eine dauerhaft anhaltende Immunität gegen die Tumorzellen.⁵¹ Auch der Graft-versus-Tumor Effekt nach allogener Stammzelltransplantation konnte mittels Treg Depletion verbessert werden und resultierte in einer erhöhten Überlebensrate.⁵² Daher ist davon auszugehen, dass der getestete Antikörper möglicherweise auch in diesem Zusammenhang einen positiven Effekt auf die Therapie haben könnte.

Auf Grundlage der Ergebnisse sowie vor dem Hintergrund der hier aufgeführten wissenschaftlichen Erkenntnisse erschien CD25 somit als geeignetes Ziel dieser vielversprechenden Therapiemethode.

5.2. Tubulysin als *toxic Payload*?

Im zweiten Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurde ein ADC aus einer bisher noch nicht getesteten Kombination aus Toxin, Linkermolekül und Antikörper hergestellt. Das resultierende Konjugat konnte dann in einem letzten Schritt evaluiert werden, um erste Erkenntnisse über die Eignung im Rahmen der AML-Therapie zu gewinnen.

Der Mitosehemmstoff Tubulysin A diene als *toxic Payload*. Als *toxic Payload* eines ADCs qualifizieren sich im Allgemeinen Toxine mit einem hohen toxischen Potential und einem bekannten sowie zuverlässigem Wirkmechanismus.¹⁸ Die Toxizität wird hierbei in der Regel über die mittlere inhibitorische Konzentration oder kurz IC_{50} ausgedrückt. Tubulysine, die Gruppe der verwendeten Toxine, besitzen IC_{50} -Werte im Bereich von 0,01 und 10 nM. Der mittels WST-1-Test bestimmte Wert des hier verwendeten Tubulysin A lag bei 0,45 nM. Monomethylauristatin E bspw. besitzt einen IC_{50} -Wert zwischen 1-5 nM und wird im ADC Präparat Brentuximab Vedotin an einen Anti-CD30 Antikörper konjugiert eingesetzt.^{53,54}

Brentuximab Vedotin erhielt 2011 die Zulassung für die Behandlung von therapierefraktären Hodgkin Lymphomen von der amerikanischen FDA und gilt als eines der Vorreiter-Präparate

im ADC Sektor.⁵⁵ Mittlerweile ebenfalls zugelassen ist Ado-Transtuzumab Emtansine, ein Konjugat aus dem Anti-HER2 Antikörper Transtuzumab und dem Maytansinoid DM1.⁵⁶

Der IC₅₀-Wert für DM-1 liegt bei 0,33 nM. Damit ist das toxische Potential von Tubulysin A durchaus mit dem von bereits etablierten Substanzen vergleichbar und der Einsatz als *toxic Payload* ist vielversprechend.⁵⁷ Nicht zuletzt aus diesem Grund scheint auch das Interesse der aktuellen ADC-Forschung an Tubulysinen zu wachsen. Das wird auch durch eine im Oktober 2014 veröffentlichte wissenschaftliche Arbeit von Cohen et al. gezeigt. Cohen und sein Team haben Tubulysin-Derivate an den Antikörper Transtuzumab konjugiert. Die Konjugate mit jeweils 2 und 4 Toxinmolekülen pro Antikörper zeigten ähnliche pharmakokinetische Eigenschaften wie der native Transtuzumab Antikörper. Im Mausmodell konnten dosisabhängige antineoplastische Effekte mit gegenüber dem Referenz-Konjugat Ado-Transtuzumab Emtansine ähnlicher Wirksamkeit gezeigt werden.⁵⁸

5.3. Das TAC-ADC

Im finalen Abschnitt wurde das hergestellte Konjugat analysiert und getestet. Eine HPLC-Messung wurde durchgeführt, um Informationen über die Integrität des Antikörpers, des Drugloads und die Reinheit der Lösung zu gewinnen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass der Antikörper bei der Reduktion an der Hinge Region gespalten wurde und an 28 % dieser Spaltprodukte über das Linkermolekül TAM zwei Tubulysine konjugiert werden konnten. Wie entscheidend die richtige Beladung des Antikörpers für die pharmakologischen und zytotoxischen Eigenschaften eines ADCs ist, wurde bereits in mehreren Studien nachgewiesen. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass die *in vitro* Zytotoxizität direkt mit der Toxinbeladung korreliert, eine Reduzierung des Drugloads *in vivo* bei höheren maximal tolerierbaren Dosen allerdings vergleichbare antineoplastische Effekte zeigt. Ein signifikanter Unterschied im Bindungsverhalten des Konjugats an das Antigen konnte nicht gezeigt werden.^{22,59} Um die optimalen Reduktionsbedingungen und die ideale Beladungszahl für das vorliegende Konjugat zu finden, sind mit Sicherheit noch weitere Versuche notwendig. Die Tatsache, dass ein grundsätzlich funktionsfähiges ADC hergestellt werden konnte, bildet jedoch eine solide Basis für diese weiterführenden Schritte. Die gewünschte Wirkung, die selektive Toxizität für CD25 positive Zellen, konnte durch die Koinkubation von CD25 positiven Karpas 299 Zellen und CD25 negativen OCI Zellen mit dem ADC und anschließender FACS Messung der Zellen gezeigt werden. Nach 8 h Koinkubation mit 100 nM des ADC konnte bei den CD25 positiven Zellen ein Rückgang der Viabilität um 50% gegenüber des Ausgangswertes gezeigt werden. Die Viabilität der CD25 negativen Zellen blieb annähernd gleich.

Nachdem es sich bei diesen Untersuchungen um Daten in einem sehr frühen Stadium der ADC Entwicklung handelt, sind Vergleiche zu industriellen ADC Entwicklungen nur eingeschränkt möglich..

Grundsätzlich kann aber gesagt werden, dass die nächsten sinnvollen Schritte eine Optimierung und Standardisierung des Herstellungsprozesses sein könnten und ein anschließender Einsatz des Konjugats im Mausmodell aus heutiger Sicht absolut sinnvoll erscheint.

6. Zusammenfassung

Maligne Erkrankungen und im Besonderen die hämatologischen Neoplasien sind komplex und gewinnen nicht nur durch den demographischen Wandel in unserer Gesellschaft immer mehr an Bedeutung. Umfangreiche Forschungsanstrengungen werden unternommen, um offene Fragen zu beantworten und der Medizin neue Wege im Kampf gegen diese Erkrankungen zu ermöglichen. Bei der AML steht vor allem die Senkung der hohen Rezidivraten und eine Verbesserung des Langzeitüberlebens, durch die Eliminierung chemorefraktärer LSCs, im Fokus. Die Immuntherapie mittels ADCs, bei der Toxine mittels monoklonaler Antikörper unmittelbar an ihren Bestimmungsort, die Tumorzellen, gebracht werden, könnte helfen dieses Ziel zu erfüllen. In diesem Zusammenhang wurden in der oben beschriebenen Arbeit zwei Fragestellungen untersucht. Erstens: Ist das Oberflächenantigen CD25 ein geeignetes Ziel für ein ADC zur Immuntherapie bei AML und zweites: Ist das Toxin Tubulysin A für den Einsatz als *toxic Payload* an solch einem ADC geeignet.

Begonnen wurde mit der Evaluierung der Expression von CD25 auf leukämischen Blasten und LSCs anhand der MFI-Ratio. Insgesamt wurden 50 Datensätze ausgewertet, wobei in 37 Fällen die Mindestgröße der LSC-Population von 40 Zellen erreicht wurde. Eine Expressionsintensität von > 2 wurde als positiv definiert. In 13,5 % der Fälle konnten CD25 positive Blastenpopulation detektiert werden. Bei den korrespondierenden LSCs lag dieser Anteil sogar bei 18,9 %. Diese überäquivalente Expressionsintensität der LSCs macht CD25 zu einem vielversprechenden Ziel für die AML-Therapie und bildet, mit den oben diskutierten weiteren Aspekten, ein stabiles Fundament für weitere Untersuchungen.

Zur Beantwortung der zweiten Fragestellung wurde zuerst ein *in vitro* System etabliert und ein funktionsfähiges Anti-CD25-Tubulysin-Konjugat hergestellt. Im Rahmen der anschließenden funktionalen Testung dieses Konjugats konnte ein selektiver Rückgang der Viabilität CD25 positiver Zellen induziert werden. Dieser selektive Viabilitätsrückgang zeigt, dass es tatsächlich gelungen ist ein funktionsfähiges ADC zu generieren, das in der Lage ist an die Zielzellen zu binden und das Tubulysin A gezielt freizusetzen. Für das Tubulysin A konnte so gezeigt werden, dass es eine ausreichende zytotoxische Potenz und wichtige andere chemische Eigenschaften besitzt, um als *toxic Payload* eingesetzt werden zu können.

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit wurde ein solide Basis für weitere Untersuchungen geschaffen, die jetzt darauf abzielen müssen den Prozess der Herstellung weiter zu optimieren und die funktionelle Testung auf ein Mausmodell auszuweiten.

7. Literaturverzeichnis

- 1 Estey, E. & Döhner, H. Acute myeloid leukaemia. *The Lancet* **368**, 1894-1907.
- 2 Lowenberg, B., Downing, J. R. & Burnett, A. Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine* **341**, 1051-1062, doi:doi:10.1056/NEJM199909303411407 (1999).
- 3 Bennett, J. M. *et al.* Proposed Revised Criteria for the Classification of Acute Myeloid Leukemia A Report of the French-American-British Cooperative Group. *Annals of Internal Medicine* **103**, 620-625, doi:10.7326/0003-4819-103-4-620 (1985).
- 4 Hossfeld, D. K. E.S. Jaffe, N.L. Harris, H. Stein, J.W. Vardiman (eds). World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. *Annals of Oncology* **13**, 490-491 (2002).
- 5 Vardiman, J. W. *et al.* The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* **114**, 937-951 (2009).
- 6 Robak, T. & Wierzbowska, A. Current and emerging therapies for acute myeloid leukemia. *Clinical Therapeutics* **31**, 2349-2370, doi:10.1016/j.clinthera.2009.11.017.
- 7 Barrett, A. J. & Le Blanc, K. Immunotherapy prospects for acute myeloid leukaemia. *Clinical & Experimental Immunology* **161**, 223-232, doi:10.1111/j.1365-2249.2010.04197.x (2010).
- 8 Barrett, A. J. Understanding and harnessing the graft-versus-leukaemia effect. *British Journal of Haematology* **142**, 877-888, doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07260.x (2008).
- 9 Schiller, G. J. *et al.* Bone marrow transplantation versus high-dose cytarabine-based consolidation chemotherapy for acute myelogenous leukemia in first remission. *Journal of Clinical Oncology* **10**, 41-46 (1992).
- 10 Kadowaki, N. & Kitawaki, T. Recent Advance in Antigen-Specific Immunotherapy for Acute Myeloid Leukemia. *Clinical and Developmental Immunology* **2011**, 7, doi:10.1155/2011/104926 (2011).
- 11 Roboz, G. J. Novel Approaches to the Treatment of Acute Myeloid Leukemia. *ASH Education Program Book* **2011**, 43-50, doi:10.1182/asheducation-2011.1.43 (2011).
- 12 Brown, C. M. S., Larsen, S. R., Iland, H. J., Joshua, D. E. & Gibson, J. Leukaemias into the 21st century: part 1: the acute leukaemias. *Internal Medicine Journal* **42**, 1179-1186, doi:10.1111/j.1445-5994.2012.02938.x (2012).
- 13 Roboz, G. J. & Guzman, M. Acute myeloid leukemia stem cells: seek and destroy. *Expert Review of Hematology* **2**, 663-672, doi:10.1586/ehm.09.53 (2009).
- 14 Felipe Rico, J., Hassane, D. C. & Guzman, M. L. Acute myelogenous leukemia stem cells: From Bench to Bedside. *Cancer Letters*, doi:10.1016/j.canlet.2012.05.034.
- 15 Bonnet, D. & Dick, J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* **3**, 730-737 (1997).
- 16 Scott, A. M., Wolchok, J. D. & Old, L. J. Antibody therapy of cancer. *Nature reviews. Cancer* **12**, 278-287 (2012).

-
- 17 Rettig, W. J. & Old, L. J. Immunogenetics of Human Cell Surface Differentiation. *Annual Review of Immunology* **7**, 481-511, doi:10.1146/annurev.iy.07.040189.002405 (1989).
 - 18 Teicher, B. A. & Chari, R. V. J. Antibody Conjugate Therapeutics: Challenges and Potential. *Clinical Cancer Research* **17**, 6389-6397, doi:10.1158/1078-0432.ccr-11-1417 (2011).
 - 19 Ducry, L. & Stump, B. Antibody–Drug Conjugates: Linking Cytotoxic Payloads to Monoclonal Antibodies. *Bioconjugate Chemistry* **21**, 5-13, doi:10.1021/bc9002019 (2009).
 - 20 Zolot, R. S., Basu, S. & Million, R. P. Antibody-drug conjugates. *Nat Rev Drug Discov* **12**, 259-260 (2013).
 - 21 Teicher, B. A. & Doroshow, J. H. The Promise of Antibody–Drug Conjugates. *New England Journal of Medicine* **367**, 1847-1848, doi:doi:10.1056/NEJMe1211736 (2012).
 - 22 Hamblett, K. J. *et al.* Effects of Drug Loading on the Antitumor Activity of a Monoclonal Antibody Drug Conjugate. *Clinical Cancer Research* **10**, 7063-7070, doi:10.1158/1078-0432.ccr-04-0789 (2004).
 - 23 Hughes, B. Antibody–drug conjugates for cancer: poised to deliver? *Nat Rev Drug Discov* **9**, 665-667 (2010).
 - 24 Mullard, A. Maturing antibody-drug conjugate pipeline hits 30. *Nat Rev Drug Discov* **12**, 329-332, doi:10.1038/nrd4009 (2013).
 - 25 Saito, Y. *et al.* Identification of Therapeutic Targets for Quiescent, Chemotherapy-Resistant Human Leukemia Stem Cells. *Science Translational Medicine* **2**, 17ra19, doi:10.1126/scitranslmed.3000349 (2010).
 - 26 Waldmann, T. Anti-Tac (daclizumab, Zenapax) in the Treatment of Leukemia, Autoimmune Diseases, and in the Prevention of Allograft Rejection: A 25-Year Personal Odyssey. *J Clin Immunol* **27**, 1-18, doi:10.1007/s10875-006-9060-0 (2007).
 - 27 Khalil, M. W., Sasse, F., Lünsdorf, H., Elnakady, Y. A. & Reichenbach, H. Mechanism of Action of Tubulysin, an Antimitotic Peptide from Myxobacteria. *ChemBioChem* **7**, 678-683, doi:10.1002/cbic.200500421 (2006).
 - 28 Schluep, T. *et al.* Polymeric Tubulysin-Peptide Nanoparticles with Potent Antitumor Activity. *Clinical Cancer Research* **15**, 181-189, doi:10.1158/1078-0432.ccr-08-1848 (2009).
 - 29 Damle, N. K. Antibody-drug conjugates ace the tolerability test. *Nat Biotech* **26**, 884-885 (2008).
 - 30 Jordan, C. T. Targeting Myeloid Leukemia Stem Cells. *Science Translational Medicine* **2**, 31ps21, doi:10.1126/scitranslmed.3000914 (2010).
 - 31 Vergez, F. *et al.* High levels of CD34+CD38low/–CD123+ blasts are predictive of an adverse outcome in acute myeloid leukemia: a Groupe Ouest-Est des Leucémies Aiguës et Maladies du Sang (GOELAMS) study. *Haematologica* **96**, 1792-1798 (2011).

-
- 32 Guo, Z. *et al.* PIM inhibitors target CD25-positive AML cells through concomitant suppression of STAT5 activation and degradation of MYC oncogene. *Blood* **124**, 1777-1789, doi:10.1182/blood-2014-01-551234 (2014).
- 33 Cerny, J. *et al.* Expression of CD25 independently predicts early treatment failure of acute myeloid leukaemia (AML). *British journal of haematology* **160**, 262-266, doi:10.1111/bjh.12109 (2013).
- 34 Gonen, M. *et al.* CD25 expression status improves prognostic risk classification in AML independent of established biomarkers: ECOG phase 3 trial, E1900. *Blood* **120**, 2297-2306, doi:10.1182/blood-2012-02-414425 (2012).
- 35 Majeti, R. Monoclonal antibody therapy directed against human acute myeloid leukemia stem cells. *Oncogene* **30**, 1009-1019, doi:10.1038/onc.2010.511 (2011).
- 36 Saito, Y. *et al.* Identification of therapeutic targets for quiescent, chemotherapy-resistant human leukemia stem cells. *Science translational medicine* **2**, 17ra19, doi:10.1126/scitranslmed.3000349 (2010).
- 37 Min, W. S., Kim, H. J., Choi, Y., Jeong, H. Y. & Kim, C. C. Interpretation of interleukin-2 receptor alpha positive cells during induction chemotherapy for adult acute myelogenous leukaemia patients. *Hematological oncology* **25**, 76-83, doi:10.1002/hon.807 (2007).
- 38 Terwijn, M. *et al.* Interleukin-2 receptor alpha-chain (CD25) expression on leukaemic blasts is predictive for outcome and level of residual disease in AML. *European journal of cancer* **45**, 1692-1699, doi:10.1016/j.ejca.2009.02.021 (2009).
- 39 Taussig, D. C. *et al.* Hematopoietic stem cells express multiple myeloid markers: implications for the origin and targeted therapy of acute myeloid leukemia. *Blood* **106**, 4086-4092, doi:10.1182/blood-2005-03-1072 (2005).
- 40 Majeti, R. *et al.* CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. *Cell* **138**, 286-299, doi:10.1016/j.cell.2009.05.045 (2009).
- 41 Hosen, N. *et al.* CD96 is a leukemic stem cell-specific marker in human acute myeloid leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 11008-11013, doi:10.1073/pnas.0704271104 (2007).
- 42 Wang, X. *et al.* Increased population of CD4(+)CD25(high), regulatory T cells with their higher apoptotic and proliferating status in peripheral blood of acute myeloid leukemia patients. *European journal of haematology* **75**, 468-476, doi:10.1111/j.1600-0609.2005.00537.x (2005).
- 43 Yang, W. & Xu, Y. Clinical significance of Treg cell frequency in acute myeloid leukemia. *International journal of hematology* **98**, 558-562, doi:10.1007/s12185-013-1436-3 (2013).
- 44 Fu, J. *et al.* Increased regulatory T cells correlate with CD8 T-cell impairment and poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *Gastroenterology* **132**, 2328-2339, doi:10.1053/j.gastro.2007.03.102 (2007).
- 45 Liu, Z. *et al.* Presence of FOXP3(+)Treg cells is correlated with colorectal cancer progression. *International journal of clinical and experimental medicine* **7**, 1781-1785 (2014).

- 46 Iikuni, N., Lourenco, E. V., Hahn, B. H. & La Cava, A. Cutting edge: Regulatory T cells directly suppress B cells in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* **183**, 1518-1522, doi:10.4049/jimmunol.0901163 (2009).
- 47 Romagnani, C. *et al.* Activation of human NK cells by plasmacytoid dendritic cells and its modulation by CD4⁺ T helper cells and CD4⁺ CD25^{hi} T regulatory cells. *European journal of immunology* **35**, 2452-2458, doi:10.1002/eji.200526069 (2005).
- 48 Chen, W. Dendritic cells and (CD4⁺)CD25⁺ T regulatory cells: crosstalk between two professionals in immunity versus tolerance. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **11**, 1360-1370 (2006).
- 49 Takeuchi, A. *et al.* A reduction of recipient regulatory T cells by cyclophosphamide contributes to an anti-tumor effect of nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation in mice. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **130**, 365-376, doi:10.1002/ijc.26009 (2012).
- 50 Fei, F. *et al.* Dasatinib inhibits the proliferation and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *British journal of haematology* **144**, 195-205, doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07433.x (2009).
- 51 Delluc, S. *et al.* Dramatic efficacy improvement of a DC-based vaccine against AML by CD25 T cell depletion allowing the induction of a long-lasting T cell response. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **58**, 1669-1677, doi:10.1007/s00262-009-0678-7 (2009).
- 52 Maury, S. *et al.* CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell depletion improves the graft-versus-tumor effect of donor lymphocytes after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Science translational medicine* **2**, 41ra52, doi:10.1126/scitranslmed.3001302 (2010).
- 53 Younes, A. *et al.* Brentuximab Vedotin (SGN-35) for Relapsed CD30-Positive Lymphomas. *New England Journal of Medicine* **363**, 1812-1821, doi:doi:10.1056/NEJMoa1002965 (2010).
- 54 Doronina, S. O. *et al.* Enhanced Activity of Monomethylauristatin F through Monoclonal Antibody Delivery: Effects of Linker Technology on Efficacy and Toxicity. *Bioconjugate Chemistry* **17**, 114-124, doi:10.1021/bc0502917 (2005).
- 55 Gualberto, A. Brentuximab Vedotin (SGN-35), an antibody–drug conjugate for the treatment of CD30-positive malignancies. *Expert Opinion on Investigational Drugs* **21**, 205-216, doi:10.1517/13543784.2011.641532 (2011).
- 56 Lambert, J. M. & Chari, R. V. J. Ado-trastuzumab Emtansine (T-DM1): An Antibody–Drug Conjugate (ADC) for HER2-Positive Breast Cancer. *Journal of Medicinal Chemistry* **57**, 6949-6964, doi:10.1021/jm500766w (2014).
- 57 Lopus, M. Antibody-DM1 Conjugates as Cancer Therapeutics. *Cancer letters* **307**, 113-118, doi:10.1016/j.canlet.2011.03.017 (2011).
- 58 Cohen, R. *et al.* Development of Novel ADCs: Conjugation of Tubulysin Analogues to Trastuzumab Monitored by Dual Radiolabeling. *Cancer Research* **74**, 5700-5710 (2014).
- 59 King, H. D. *et al.* Monoclonal Antibody Conjugates of Doxorubicin Prepared with Branched Linkers: A Novel Method for Increasing the Potency of Doxorubicin

Immunoconjugates. *Bioconjugate Chemistry* **10**, 279-288, doi:10.1021/bc980100i (1999).

8. Anlagen

8.1. Abkürzungsverzeichnis

ADC	antibody-drug-conjugate
ADCC	antibody dependent cellular cytotoxicity
AK	Antikörper
AML	Akute myeloische Leukämie
ATL	Adulte T-Zell Leukämie
BCA	bicinchoninic acid
BFU-E	Burst forming unit-erythroid
bzw.	beziehungsweise
bspw.	beispielsweise
°C	Grad Celsius
CD	cluster of differentiation
CDC	Complement Dependent Cytolysis
CFU	colony forming units
CFU-G	Colony forming unit-granulocyte
CFU-GM	Colony forming unit-granulocyte, macrophage
CFU-M	Colony forming unit-macrophage
CLL-1	C-Type Lectin-Like Molecule 1
CO ₂	Kohlendioxid
DEPC	Diethyldicarbonat
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTNB	Ellman's Reagenz (2,2'-Dinitro-5,5'-Dithiodibenzoessäure)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
FACS	fluorescence-activated cell sorter
FAB	French-American-British
FCS	fetal calf serum
FDA	US Food and Drug Administration
FSC	Forward Scatter
GVH	Graft-versus-host
GVL	Graft-versus-leukaemia
h	Stunden
H ₂ O	Wasser
HCL	Salzsäure
HPLC	high performance liquid chromatography
HSC	hämatopoetische Stammzellen
IC ₅₀	inhibitory concentration of half-maximal effect
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IMDM-Medium	Iscoe's Modified Dulbecco's-Medium
Kat. No.	Katalognummer
kDa	kilo Dalton
LSC	leukemic stem cells
mAb	monoklonal Antibody
MACS	magnetic activated cell separation
max.	maximal
MFI	mean fluorescence intensity
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMAE	Monomethyl Auristatin E

MNC	mononuclear cells
MRD	minimal residual disease
MWCO	moleculal weight cut off
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
N	Normalität / Äquivalenzkonzentration
N-ACC	N-Acetyl-L-Cystein
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
nm	Nanometer
NTB	2-nitro-5-thiobenzoat
PBS	phosphate buffered saline
pH	potentia hydrogenii
rpm	rotations per minute
RPMI-Medium	Roswell Park Memorial Institute-Medium
RT	Raumtemperatur
SH	Thiolgruppe
SSC	Side Scatter
Treg	T-regulatorischer Lymphozyten
Tris HCL	Mit Tris gepufferte Salzsäure
U/min	Umdrehungen pro Minute
VLE	very low endotoxin
WHO	World Health Organization
WST-1	water soluble tetrazolium
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung

8.2. Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich in erster Line bei meinen Eltern, die mir das Medizinstudium und damit auch die Arbeit an dieser Dissertation ermöglicht haben.

Dass die Arbeit im Labor zu einer wundervollen Zeit wurde, liegt vor allem am tollen Team der Arbeitsgruppe und selbstverständlich an meiner Betreuerin Dr. Barbara Beck. Für viel Geduld in der Anfangsphase und ein herzliches und angenehmes Arbeitsklima möchte ich mich im Besonderen bei Christina Krupka, Amelia Sili, Lisa-Maria Köhler und Dr. Frauke Schnorfeil bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter, Prof. Dr. med. Marion Subklewe. Für Ihr Vertrauen und ihre Unterstützung möchte ich mich von ganzem Herzen bedanken.

Eidesstattliche Versicherung

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand